

Tof2 - ein nukleolarer Aktivator der Phosphatase Cdc14 unterstützt die rDNA Trennung in *S. cerevisiae*

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III
– BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN –
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG



vorgelegt von
Christine Geil
aus Speyer

Juni 2008

Promotionsgesuch eingereicht am:	25.06.2008
Die Arbeit wurde angeleitet von:	Prof. Dr. Wolfgang Seufert
Prüfungsausschuss:	
Vorsitzender:	Prof. Dr. Reinhard Wirth
Erstgutachter:	Prof. Dr. Wolfgang Seufert
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Herbert Tschochner
Dritter Prüfer:	Prof. Dr. Stephan Schneuwly

*Sein und Wissen ist ein uferloses Meer:
je weiter wir vordringen, umso unermesslicher
dehnt sich aus, was noch vor uns liegt,
jeder Triumph des Wissens schließt
hundert Bekenntnisse des Nichtwissens ein.*

(Isaac Newton)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
1. ZUSAMMENFASSUNG	8
2. ABSTRACT	10
3. EINLEITUNG	12
3.1 Die Bäckerhefe <i>S. cerevisiae</i> als eukaryontischer Modellorganismus	12
3.2 Der Zellteilungszyklus und dessen Regulation in <i>S. cerevisiae</i>	13
3.2.1 Die <i>CDC</i> -Gene	13
3.2.2 Der Zellteilungszyklus in <i>S. cerevisiae</i>	13
3.2.3 Regulation des Zellteilungszyklus durch zyklinabhängige Kinasen	15
3.2.4 Regulation des Zellteilungszyklus durch Proteinabbau	16
3.3 Der Austritt aus der Mitose	18
3.3.1 Die Phosphatase Cdc14	18
3.3.2 Die Inhibition der Phosphatase Cdc14	19
3.3.2.1 Struktur des Nukleolus und Anordnung der rDNA	20
3.3.2.2 Net1 - Inhibitor von Cdc14, Sir2-Verankerung, nukleolare Strukturkomponente	21
3.3.3 Die Aktivierung der Phosphatase Cdc14 – FEAR und MEN	22
3.3.4 Das FEAR Netzwerk	23
3.3.5 Molekulare Mechanismen der Cdc14-Freisetzung	24
3.3.6 Funktionen des FEAR Netzwerk	25
3.3.6.1 Initiierung des MEN	25
3.3.6.2 Die Stabilisierung der Anaphase-Spindel und Kernpositionierung	26
3.3.6.3 Die Trennung der rDNA	27
3.3.7 Das Mitotic Exit Network (MEN)	28
3.3.8 Funktionen des MEN	29
3.3.8.1 Die Inaktivierung zyklinabhängiger Kinasen	30
3.3.8.2 Die Initiierung der Zytokinese	30
3.3.9 Zusammenfassende Darstellung der Cdc14-Regulation über FEAR und MEN	31
3.3.10 Die Inaktivierung von Cdc14 und das AMEN	32
3.3.11 Funktionen von Cdc14 Homologen in anderen Organismen	32
3.4. Das Net1-verwandte nukleolare Protein Tof2	34
4. ERGEBNISSE	36
4.1 Tof2 Lokalisation während des Zellteilungszyklus	36
4.2 Interaktion von Tof2 mit Cdc14 <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	38
4.2.1 Tof2 interagiert mit Cdc14 <i>in vivo</i>	38
4.2.2 Der N-terminale Teil von Tof2 ist notwendig und hinreichend für die Interaktion mit Cdc14 <i>in vivo</i>	39

4.2.3 N-und C-terminale Bereiche tragen zur Lokalisation von Tof2 bei	41
4.2.4 Unterschiedliche Bindungsspezifität von Tof2 und Net1 für Cdc14 <i>in vivo</i>	43
4.2.5 Tof2 interagiert mit Cdc14 sowohl in der S-Phase als auch in der Metaphase	44
4.2.6 Die Tof2 Interaktion mit Cdc14 nimmt innerhalb der Anaphase ab	46
4.2.7 Tof2 interagiert mit Net1 <i>in vivo</i>	48
4.2.8 Tof2 interagiert nicht mit Cdc14 in <i>net1-Δ</i> Mutanten	49
4.2.9 Tof2 interagiert mit Cdc14 <i>in vitro</i>	50
4.3 Tof2, ein zu Net1 alternativer nukleolarer Anker für Cdc14?	52
4.3.1 Cdc14 lokalisiert in <i>tof2-Δ</i> Mutanten im Nukleolus	53
4.3.2 Cdc14 und Tof2 sind delokalisiert in <i>net1-Δ</i> Mutanten	55
4.3.2.1 Cdc14 und Tof2 sind delokalisiert in <i>net1-Δ</i> Mutanten nach der Transformation mit <i>RRN3</i>	56
4.3.2.2 N-terminale Verkürzungen von Net1 sind delokalisiert	58
4.4 <i>In vitro</i> Aktivität von Cdc14 in Abhängigkeit von Tof2 und Net1	61
4.5 <i>In vivo</i> Funktion von Tof2	64
4.5.1 <i>In vivo</i> Vergleich von Tof2 und Net1	64
4.5.1.1 Eine <i>tof2-Δ</i> Mutante supprimiert nicht den Phänotyp einer <i>cdc15-2</i> Mutante	64
4.5.1.2 Eine <i>TOF2</i> Überexpression ist nicht toxisch für die Hefe <i>S. cerevisiae</i>	65
4.5.2 Tof2 unterstützt die biologische Funktion von Cdc14 <i>in vivo</i>	67
4.5.2.1 Cdc14 Lokalisation nach der Überexpression von <i>TOF2</i>	67
4.5.2.2 Genetische Interaktionen der <i>tof2</i> -Deletionsmutante	70
4.5.3 Phänotyp und Zellzyklusprogression der <i>tof2</i> -Deletionsmutante	73
4.5.4 Mikrotubulustrukturen in <i>tof2-Δ</i> Mutanten sind unverändert	75
4.5.5 Die Trennung des Nukleolus in <i>tof2-Δ</i> Mutanten ist verzögert	77
4.5.5.1 Analyse der Trennung des Nukleolus in asynchronen <i>tof2-Δ</i> Mutanten	77
4.5.5.2 Analyse der Trennung des Nukleolus in synchronen <i>tof2-Δ</i> Mutanten	79
4.5.6 Vergleich der Trennung des Nukleolus in <i>tof2-Δ</i> und <i>top1-Δ</i> Mutanten	82
4.5.7 Condensin ist partiell delokalisiert während der Anaphase in <i>tof2-Δ</i> Mutanten	84
5. DISKUSSION	86
5.1 Tof2 interagiert mit Cdc14 <i>in vitro</i> und formt mit der Phosphatase und Net1 einen gemeinsamen Komplex <i>in vivo</i>	87
5.2 Tof2 stimuliert die Cdc14 Aktivität <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	90
5.3 Tof2 - ein nukleolarer Aktivator der Phosphatase Cdc14, der die rDNA Trennung unterstützt	93
5.4 Modell zur Regulation von Cdc14 durch Tof2	96
6. MATERIAL	99
6.1 Antikörper	99

6.2 Enzyme	100
6.3 Nukleinsäuren	100
6.4 Geräte	100
6.5 Chemikalien	102
6.6 sonstige Materialien	104
6.7 Medien	105
6.7.1 Bakterienmedien	105
6.7.2 Hefemedien	106
6.8 Puffer und Lösungen	108
6.9 Bakterienstämme	113
6.10 Hefestämme	114
6.11 Plasmide und Vektoren	117
6.12 Oligonukleotide	119
7. METHODEN	123
7.1 Arbeiten mit Bakterien	123
7.1.1 Kultivierung von Bakterien in Flüssigmedium	123
7.1.2 Transformation von elektrokompetenten <i>E. coli</i> Zellen	123
7.1.2.1 Herstellung elektrokompetenter Zellen	123
7.1.2.2 Elektroporation	124
7.1.3 Produktion rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	124
7.1.4 Coexpression rekombinanter Proteine in <i>E.coli</i>	125
7.2 Arbeiten mit Hefe	126
7.2.1 Kultivierung von Hefestämmen in Flüssigmedium	126
7.2.2 Synchronisation von Hefestämmen	126
7.2.2.1 Elutriation	126
7.2.2.2 Synchronisation durch die Deletion von <i>CDC20</i>	127
7.2.3 Aufbewahrung von Hefestämmen	127
7.2.4 Kreuzung haploider Hefestämme	128
7.2.5 Sporulation diploider Hefestämme und Tetradenanalyse	128
7.2.6 Hefetransformation nach der Lithiumacetat-Methode	129
7.2.7 Integration von Genen in das Hefegenom	130
7.2.8 Wachstumstest von Hefestämmen über Verdünnungsreihen	130
7.3 Färbung und Mikroskopie von Hefezellen	131
7.3.1 Fixierung von Hefezellen mit Ethanol	131
7.3.2 Fixierung von Hefezellen mit Formaldehyd	131

7.3.3 Färbung von Hefezellen mit DAPI	131
7.3.4 Färbung der Zellen mit ConA-FITC	132
7.3.5 Indirekte Immunfluoreszenz und Mikroskopie	132
7.3.5.1 Beschichtungen der Objektträger mit Polylysin	132
7.3.5.2 Vorbereitung der Proben für die indirekte Immunfluoreszenz	133
7.3.6 Durchflußzytometrie	133
7.4 Molekularbiologische Arbeitsmethoden	134
7.4.1 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	134
7.4.2 Agarosegel-Elektrophorese	134
7.4.3 DNA-Elution aus Agarosegelen	135
7.4.4 Ligation von DNA-Fragmenten	135
7.4.5 Plasmidpräparation nach der Kochlysatzmethode für Plasmide mit hoher Kopienzahl (high copy)	136
7.4.6 Plasmidpräparation durch alkalische Lyse für Plasmide mit niedriger Kopienzahl (low copy)	136
7.4.7 Plasmidpräparation mit dem JETSPIN Kit im größeren Maßstab	136
7.4.8 Bestimmung von Konzentration und Reinheit einer DNA-Lösung	137
7.4.9 Gesamt-DNA Präparation aus <i>S. cerevisiae</i>	137
7.4.10 Die Polymerase-Kettenreaktion	137
7.4.11 Kolonie-PCR	139
7.4.11.1 Kolonie-PCR zur Bestimmung des Paarungstyps [Huxley <i>et al.</i> 1990]	139
7.4.12 PCR zur Amplifikation von Genen	140
7.4.13 PCR zur Genommanipulation [Longtine <i>et al.</i> 1998, Gauss <i>et al.</i> 2005]	141
7.4.14 PCR-Amplifikation zur Bestimmung der Integrationszahl	142
7.5 Proteinbiochemische Arbeitsmethoden	143
7.5.1 Herstellung von Zelllysaten aus <i>E.coli</i>	143
7.5.2 Herstellung von Proteinrohextrakten aus Hefezellen	143
7.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	144
7.5.4 Färbung von SDS-Gelen	144
7.5.5 Western-Blot und immunologischer Nachweis von Proteinen	145
7.5.6 Immunpräzipitation/Coimmunpräzipitation	146
7.5.7 Affinitätspräzipitation rekombinanter Proteine	147
7.5.8 Affinitätsreinigung rekombinanter Proteine	147
7.5.9 Messung der Phosphatase Aktivität	147
8. LITERATURVERZEICHNIS	149
DANKSAGUNG	159
LEBENS LAUF	160

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α -	anti
Δ	Deletion eines Gens
Ω	Ohm, Einheit des Widerstands
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
μ	Mikro (10^{-6})
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μF	Mikrofarad, Einheit der elektrischen Kapazität
A	
Amp	Ampicillin
APC	<i>anaphase promoting complex</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AMEN	<i>antagonist of MEN</i>
AS	Aminosäure
ATP	2'-Desoxyadenosintriphosphat
B	
bp	Basenpaar (<i>base pair</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
bzw.	beziehungsweise
C	
Camp	Chloramphenicol
CDC	<i>cell division cycle</i>
CDK	<i>cyclin dependent kinase</i> (zyklinabhängige Kinase)
CKA	<i>cyclin dependent kinase activator</i>
CKI	<i>cyclin dependent kinase inhibitor</i>
clonNAT	Nourseothricin
ConA	Concanavalin A
C-Terminus	Carboxy-Ende einer Polypeptidkette
D	
D	Glucose
Da	Dalton
DAPI	4', 6'-Diamidino-2-phenylindol
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonuleinsäure)
dNTP	2'-Desoxynucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
evtl.	Eventuell

F

FEAR *Cdc fourteen early anaphase release*
fwd *forward*

G

g Gramm
Gal Galaktose
GAP *GTPase activating factor*
GEF *guanine nucleotide exchange factor*
GDP Guanosin-Diphosphat
GTP Guanosin-Triphosphat

H

h *hour* (Stunde)
ha Hämagglutinin-Epitop
his6 6 x Histidin
HRP *horse radish peroxidase*
HU Hydroxyurea (Hydroxyharnstoff)

K

k Kilo (10^3)
kb Kilobase
kDa Kilodalton
kPa Kilopascal
kV Kilovolt

L

l Liter
LB Luria Broth, Bakterienmedium

M

M Molar (Mol/Liter)
mA Milliampere
mbp *maltose binding protein* (Maltosebindeprotein)
malE Maltosebindeprotein (Genname)
MEN *mitotic exit network*
mg Milligramm
min Minute
ml Milliliter
mM Millimolar
myc c-myc-Epitop

N

NOC Nocodazol
N-Terminus Amino-Ende einer Polypeptidkette

O

OD₆₀₀ Optische Dichte bei der Wellenlänge 600 nm
ORF *open reading frame* (offener Leserahmen)

P

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Saline)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
<i>pGAL1</i>	Galktose-induzierbarer Promotor
<i>pGALL</i>	abgeschwächter Galktose-induzierbarer Promotor
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pNPP	para-Nitrophenylphosphat
<i>pTEF2</i>	konstitutiver Promotor aus <i>Ashbya gossypii</i>
<i>prhaBAD</i>	Rhamnose-induzierbarer Promotor

R

Raf	Raffinose
RBS	Ribosomen-Bindungsstelle
rDNA	ribosomale DNA
RENT	<i>regulator of nucleolar silencing and telophase</i>
rev	<i>reverse</i>
RNase	Ribonuklease

S

<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCF	Ubiquitinligasekomplex aus Skp1, Cullin und F-Box Protein
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SPB	<i>spindle pole body</i> (Spindelpolkörper)

T

TAE	Tris/Acetat/EDTA Puffer
TBS	Tris-gepufferte Saline
TBS-T	Tris-gepufferte Saline mit Tween
<i>tCYC1</i>	Terminator des Gens <i>CYC1</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan

U

U	Unit (Enzymmenge)
Upm	Umdrehung pro Minute
UV	ultraviolettes Licht

W

WCE	<i>whole cell extract</i> (Gesamtzellextrakt)
WT	Wildtyp

Aminosäuren werden nach den internationalen Regeln abgekürzt. Die Schreibweise der Gene und Proteine richtet sich nach der Hefenomenklatur. Gängige Fachausdrücke aus dem Englischen wurden übernommen, wenn eine deutsche Entsprechung nicht existiert oder gebräuchlich ist.

1. ZUSAMMENFASSUNG

Die Phosphatase Cdc14 ist ein wichtiger Regulator der Mitose in der Hefe *S. cerevisiae*. Cdc14 gehört zur Familie der Ser/Thr Phosphatasen und ist bis zum Menschen konserviert. In *S. cerevisiae* ist Cdc14 essentiell für den Austritt aus der Mitose. Durch seine Phosphatase Aktivität wirkt Cdc14 den Phosphorylierungsereignissen der zyklinabhängigen Kinase Cdc28 entgegen und ist an deren Inhibition und dem Abbau mitotischer Zykline am Ende der Mitose beteiligt. Weitere Ereignisse, die am Ende der Mitose von Cdc14 vermittelt werden, sind die Stabilisierung der Spindel, die Positionierung des Zellkerns, die Trennung der rDNA und die Einleitung der Zytokinese. Die Aktivität der Phosphatase muss daher für einen korrekten Ablauf des Zellteilungszyklus streng reguliert werden. Cdc14 wird bis zur Metaphase über den N-terminalen Teil von Net1 im Nukleolus verankert und somit inhibiert. Jüngste Studien haben gezeigt, dass Cdc14 und Net1 Teil eines größeren Netzwerks nukleolarer Proteine darstellen, das auch das Net1-verwandte Protein Tof2 enthält. Tof2 ist am regionspezifischen rDNA-*silencing* beteiligt, seine genaue zelluläre und molekulare Funktion ist jedoch noch weitestgehend unverstanden. Aufgrund der 30%-igen Sequenzidentität des N-terminalen Bereichs von Tof2 zu dem für die Cdc14 Verankerung und Inhibition verantwortlichen N-terminalen Bereich von Net1 sollte eine mögliche Verbindung von Tof2 und Cdc14 analysiert werden.

Über indirekte Immunfluoreszenz konnte gezeigt werden, dass Tof2 während des gesamten Zellteilungszyklus im Nukleolus lokalisiert. Weiterhin machten *in vivo* Interaktionsstudien deutlich, dass die nukleolaren Proteine Tof2, Cdc14 und Net1 in einem gemeinsamen Komplex vorliegen und der N-terminale Teil von Tof2 notwendig und hinreichend ist für die Assoziation mit der Phosphatase. In einer *in vitro* Interaktionsstudie war es außerdem möglich, die direkte Bindung von Cdc14 an den N-terminalen Bereich von Tof2 nachzuweisen. Aufgrund der Ähnlichkeiten von Tof2 und Net1 innerhalb ihrer N-terminalen Sequenzen und der Interaktion mit Cdc14, wurde auf die Ähnlichkeit ihrer Funktionen *in vitro* und *in vivo* getestet. *In vitro* Messungen der Phosphatase Aktivität zeigten, dass Tof2 anders als Net1 kein Inhibitor der Phosphatase Cdc14 ist, sondern deren Aktivität stimuliert. Auch *in vivo* verhielt sich Tof2 nicht wie ein Inhibitor der Phosphatase, im Unterschied zu Net1 unterstützt Tof2 die biologische Funktion von Cdc14.

Analysen einer *tof2*-Deletionsmutante ergaben eine größtenteils normale Progression durch den Zellteilungszyklus mit einer marginalen Verzögerung der Anaphase/Telophase und Zytokinese. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Nukleolustrennung in der

Deletionsmutante beeinträchtigt ist. Lokalisationsstudien des etablierten nukleolaren Markers Net1 in einer asynchronen Kultur von *tof2-1* Mutanten machten deutlich, dass über 50% der analysierten Anaphase Zellen eine asymmetrische Verteilung des Nukleolus bzw. nukleolare Brücken zwischen den bereits weit voneinander getrennten Kernen zeigten. Eine zeitliche Abschätzung ergab, dass Mutanten, die eine Deletion von *TOF2* aufweisen, circa 50 Minuten benötigten, um ihre rDNA komplett zu trennen, während sich diese Zeit bei dem Kontrollstamm auf 25 Minuten berechnen ließ. Analysen synchroner Kulturen bestätigten die verzögerte Trennung des Nukleolus in der *tof2-1* Mutante. Der Prozess der Kompaktierung und Trennung der rDNA wird durch Condensin vermittelt, das in einer Cdc14-abhängigen Weise während der Anaphase an der rDNA lokalisiert. Diese nukleolare Lokalisation des heteropentameren Condensin-Komplexes während der Anaphase wurde über indirekte Immunfluoreszenz der Condensinuntereinheit Smc4 untersucht. Es wurde deutlich, dass Smc4 in der *tof2*-Deletionsmutante während der Anaphase nicht nur auf den Nukleolus beschränkt ist sondern auch im Zellkern und Nukleoplasma lokalisiert.

All diese Daten zusammengekommen weisen darauf hin, dass ToF2 Cdc14 *in vivo* unterstützt und zwar dahingehend, dass es die Rekrutierung von Condensin an die rDNA während der Anaphase erleichtert und somit zu einer korrekten Trennung der rDNA beiträgt. Dies könnte dadurch bewerkstelligt werden, dass ToF2, das auch während der Anaphase im Nukleolus lokalisiert, einen Pool von aktivem Cdc14 in dieser Phase des Zellzyklus an der rDNA zurückhält. Dadurch wäre es Cdc14 möglich auf bestimmte Zielproteine an der rDNA zu wirken, um diese auf eine erfolgreiche Bindung von Condensin vorzubereiten.

2. ABSTRACT

The phosphatase Cdc14 is an important regulator of mitosis in *S. cerevisiae*. Cdc14 belongs to the family of dual specificity Ser/Thr phosphatases and is conserved from yeast to humans. In *S. cerevisiae* Cdc14 is essential for mitotic exit. Cdc14 antagonizes cyclin dependent kinases and promotes multiple post-metaphase events including spindle stabilization, nuclear positioning, rDNA separation and cytokinesis. To guarantee a correct progression of the cell cycle, Cdc14 activity needs to be strictly regulated. From G1 to metaphase the phosphatase associates with the N-terminal part of Net1, which restricts it to the nucleolus thus inhibiting its proper function. Recently, Cdc14 and Net1 were shown to be part of a larger network of nucleolar proteins containing also the Net1 related protein Tof2. The latter was linked to region specific rDNA-silencing, however its cellular and molecular functions remain still elusive. Given that the N-terminal parts of Tof2 and Net1 share 30% sequence identity, it seemed possible that Tof2 associates with Cdc14 similar to the interaction of Net1 with Cdc14.

By indirect immunofluorescence Tof2 was localized to the nucleolus throughout the cell division cycle. Furthermore, *in vivo* interaction studies revealed a complex of the nucleolar proteins Tof2, Cdc14 and Net1. Here, it was shown that the N-terminal part of Tof2 is necessary and sufficient for the association with the phosphatase. Analysis of protein-protein interaction *in vitro* indicated that Cdc14 bound to the N-terminal part of Tof2 directly. Inspired by the regulating influence of the N-terminal part of Net1 on Cdc14, the observed interaction of Tof2 and Cdc14 was analysed for similar features. Using an *in vitro* phosphatase assay it was shown that in contrast to the Cdc14 inhibition by Net1, Tof2 stimulates the phosphatase activity of the protein. Subsequent *in vivo* experiments also supported the notion that Tof2 is not an inhibitor but rather an activator of Cdc14.

The *tof2-Δ* mutant exhibited predominantly normal cell cycle progression with little effect on anaphase/telophase and cytokinesis. Further analysis showed that the deletion of *TOF2* delayed rDNA segregation. When the separation of the nucleolar marker Net1 was tested in asynchronous cultures of *tof2-Δ* cells it became apparent that more than 50% of the analysed anaphase cells contained an asymmetric separated nucleolus or nucleolar bridges between already separated nuclei. Estimation of the time needed to complete rDNA separation yielded a time span of 50 minutes for the *tof2-Δ* mutant compared to 25 minutes for the wild type control. Experiments with synchronous cultures of *tof2-Δ* cells supported the delayed separation of the nucleolus. Condensin, which localizes to the rDNA in a Cdc14 dependent

manner during anaphase, mediates the compaction and separation of rDNA. The nucleolar localization pattern of the heteropentameric condensin complex during anaphase was examined using indirect immunofluorescence microscopy of the condensin subunit Smc4. This test revealed that Smc4 in contrast to wild type cells is not restricted to the nucleolus of *tof2-1* mutants but localizes to the nucleus and the nucleoplasm in anaphase.

In conclusion, these results suggest a Cdc14 supporting role for Tof2 *in vivo*, facilitating the allocation of condensin to the rDNA during anaphase and by this means contributing to a correct separation of the rDNA. This could be possibly achieved by Tof2, which localises to the nucleolus throughout the cell division cycle retaining a pool of active Cdc14 at the rDNA during anaphase. This provides a mechanism by which Cdc14 may act on critical target proteins in the immediate vicinity of the rDNA locus.

3. EINLEITUNG

3.1 Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* als eukaryontischer Modellorganismus

Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* ist ein beliebter Modellorganismus [Sherman 1997], um die genetische Komplexität eukaryontischer Zellen zu analysieren, da viele der circa 6200 Hefegene Homologe im Genom höherer Eukaryonten haben. Probleme der Vielzeller-Entwicklung müssen bei der Analyse von *S. cerevisiae* nicht beachtet werden, da es sich um einen kleinen einzelligen Pilz, der zur Gruppe der Ascomyceten (Schlauchpilze) gehört, handelt. Ein weiterer Vorteil der Bäckerhefe liegt in ihrer einfachen Handhabung im Laboralltag und in ihrer kurzen Generationszeit, bei reichlich vorhandenen Nährstoffen liegt sie bei 90-120 min. Zudem ist seit 1996 das Hefegenom vollständig sequenziert (circa 6200 Gene auf 16 linearen Chromosomen) [Goffeau *et al.* 1996] und zusammen mit gut etablierten Methoden zur genetischen Manipulation, lassen sich innerhalb kurzer Zeit Stämme mit den gewünschten genetischen Eigenschaften herstellen. Die Einfachheit der genetischen Manipulation der Bäckerhefe ist vor allem dadurch gegeben, dass sie sich im haploiden Zustand kultivieren lässt. Auf diese Weise können Mutationen ohne das Vorhandensein des Wildtypallels leicht analysiert werden. Haploide Hefezellen können zwei unterschiedliche Paarungstypen, a oder α , aufweisen, deren Zusammentreffen eine Verschmelzung zur Folge hat, so dass eine diploide Hefezelle entsteht. Ist kein zutreffender Partner des entgegengesetzten Paarungstyps vorhanden, gibt es außerdem die Möglichkeit des Paarungstypwechsels. Man spricht von Homothallismus. Um im Labor die stabile Kultivierung haploider Stämme zu ermöglichen, handelt es sich bei den Laborstämmen von *S. cerevisiae* um heterothallische Stämme, die so manipuliert wurden, dass sie ihre Fähigkeit, den Paarungstyp zu wechseln, verloren haben. Die gezielte Kreuzung haploider Stämme mit bestimmten genetischen Merkmalen führt zur Entstehung diploider Stämme, in denen durch Mangelbedingungen eine Meiose eingeleitet werden kann. Innerhalb einer Meiose kommt es zur Ausbildung vier haploider Sporen in einem Ascus (Tetrade), die mit Hilfe eines Mikromanipulators voneinander getrennt und durch den Einsatz geeigneter genetischer Marker analysiert bzw. genotypisch bestimmt werden können. Auf diese Weise können die Auswirkungen der Kombination genetischer Merkmale untersucht werden.

Außerdem besitzt die Bäckerhefe eine hohe Rate an homologer Rekombination, ein weiterer Vorteil um Hefegene auf einfache Art und Weise manipulieren zu können beispielsweise

durch Deletion oder Epitopmarkierung [Longtine *et al.* 1998; Gauss *et al.* 2005]. Gene können weiterhin stabil auf extrachromosomalen Plasmiden in der Hefe propagiert werden.

All diese Eigenschaften machen die Bäckerhefe zu einem geeigneten und beliebten Organismus für genetische Untersuchungen, die zur Aufklärung vieler elementarer Lebensvorgänge beitragen bzw. beigetragen haben. Ein Beispiel ist der Zellteilungszyklus, dessen grundlegenden Mechanismen zwischen *S. cerevisiae* und höheren Eukaryonten stark konserviert sind.

3.2 Der Zellteilungszyklus und dessen Regulation in *S. cerevisiae*

3.2.1 Die *CDC*-Gene

Die Abläufe des Zellzyklus wurden mit Zellteilungsmutanten der Hefe, die als *cdc* (*cell division cycle*)-Mutanten bezeichnet werden, erforscht [Hartwell 1974, 1978]. Die *CDC*-Gene sind in der Regel essentiell, ohne sie ist ein weiteres Fortschreiten im Zellteilungszyklus nicht möglich. *cdc*-Mutanten zeigen somit einen bestimmten Arrest Phänotyp je nach Funktion des mutierten Proteins und können daher nur kultiviert werden, wenn die jeweilige Mutation konditional ist. Das bedeutet, dass das Genprodukt nur unter bestimmte Bedingungen inaktiv ist. Die meisten Zellzyklusmutanten sind temperatursensitiv. In diesem Fall ist das Genprodukt bei niedrigen Temperaturen (permissive Bedingungen, 25°C) funktionell, wird jedoch durch die Verschiebung zu höheren Temperaturen (restriktive Bedingungen, 37°C) inaktiviert. Nach der Temperaturerhöhung durchlaufen die *cdc*-Mutanten den Zellteilungszyklus bis zu dem Punkt, wo die Funktion des mutierten Proteins für den weiteren Ablauf gebraucht wird, dort arretieren sie. Durch die Charakterisierung des jeweiligen Arrest Phänotyps solcher Mutanten war und ist es möglich, den Zellzyklus molekular zu untersuchen. Inzwischen wurden mehr als 70 solcher Gene in *S. cerevisiae* identifiziert, darunter auch *CDC28*, das für eine zentrale Komponente des Zellzyklus-Kontroll Systems in der Bäckerhefe codiert.

3.2.2 Der Zellteilungszyklus in *S. cerevisiae*

In den meisten eukaryontischen Organismen und so auch in Hefe ist der Zellteilungszyklus als eine geordnete Abfolge von Ereignissen anzusehen, die letztendlich zu einer Verdopplung der Zelle führen. Wie in Abbildung 3.1 zu sehen ist, wird der Zellzyklus in vier Hauptphasen eingeteilt, die als G1-, S-, G2- und M-Phase bezeichnet werden [Lew *et al.* 1997].

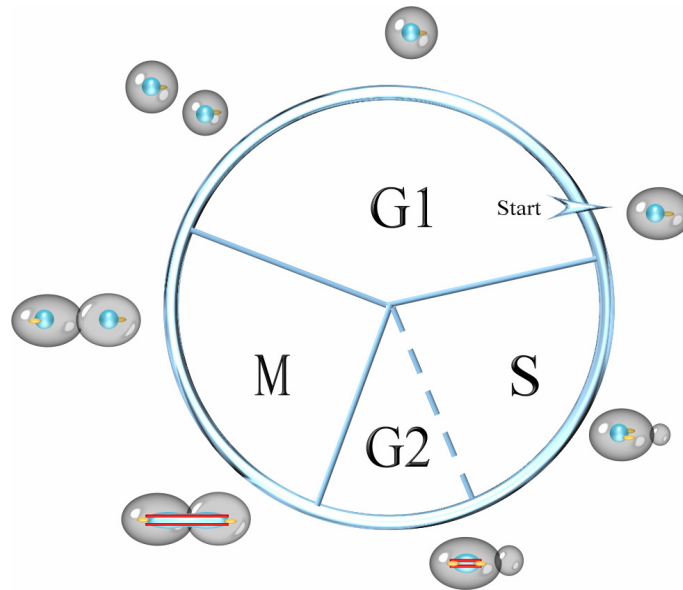


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Zellzyklus in *S. cerevisiae*

Die vier Hauptphasen des Zellzyklus werden als G1-, S-, G2- und M-Phase bezeichnet. Nach Überschreiten des START-Punktes in der G1-Phase findet die DNA-Replikation statt (S-Phase). Zeitgleich dazu bildet sich eine Knospe aus und die Spindelpolkörper wandern nach ihrer Verdopplung an die entgegengesetzten Pole des Zellkerns. Die zwischen der S- und M-Phase auftretende G2-Phase ist in *S. cerevisiae* nicht sehr ausgeprägt. In der sich anschließenden M-Phase (Mitose) findet die Kernteilung statt. Die Zytokinese schließt den Zellzyklus ab. Daraufhin befinden sich die Mutter- und neu entstandene Tochterzelle wieder in der G1-Phase und können einen erneuten Teilungszyklus durchlaufen.

Innerhalb der G1-Phase (*gap*) findet zunächst ein Zellwachstum statt bis eine kritische Zellgröße erreicht ist. Die Zellgröße, die Verfügbarkeit von Nährstoffen und die Anwesenheit eines Paarungspartners sind Faktoren, die das Überschreiten des so genannten START-Punktes innerhalb der G1-Phase bestimmen. Die Dauer dieser Phase ist somit stark von äußeren Bedingungen abhängig. Ist der START-Punkt erst einmal überschritten, wird der Zellteilungszyklus vollständig bis zur nächsten G1-Phase durchlaufen [Herskowitz *et al.* 1988], auch wenn sich die anfänglich günstigen Bedingungen ändern. Kurz nach der Überschreitung des START-Punktes beginnt in der S-Phase (Synthese) die Replikation der DNA. Parallel dazu wird die Ausbildung einer Knospe initiiert, was in Abhängigkeit vom Aktinzytoskelett, das noch vor der Knospenbildung am Ort ihrer Entstehung polarisiert [Pruyne & Bretscher 2000], erfolgt. Sekretorische Vesikel, die das Aktinzytoskelett an die Zelloberfläche leitet, wo sie fusionieren, führen zu einem anisotropen Längenwachstum der Knospe. Weiterhin wird in der S-Phase der Spindelpolkörper verdoppelt (SBP: *spindle pole body*). Die zwei entstehenden SBP, deren Pendant in höheren Eukaryonten die Zentrosomen darstellen, bilden die Zentren für die Ausbildung und Ausrichtung der mitotischen Spindel

bestehend aus den zytoplasmatischen und nuklearen Mikrotubuli. Während der S-Phase wandern die Spindelpolkörper auseinander an die entgegengesetzten Pole des Zellkerns. Die Plus-Enden zytoplasmatischer Mikrotubuli und ihre Interaktion mit dem Zellkortex sind notwendig für eine korrekte Ausrichtung der mitotischen Spindel [Adames & Cooper 2000, Beach *et al.* 2000, Segal & Bloom 2001], was letztendlich die exakte Aufteilung der Schwester-Chromatiden auf Mutter- und Tochterzellen bedingt. In der G2/M-Phase erfolgt ein isotropes Wachstum der Tochterzelle, nachdem das Aktinzytoskelett depolymerisiert wurde und sich Aktinflecken auf der gesamten Tochterzelle verstreut haben. Am Ende des Knospenwachstums wird das Aktinzytoskelett wieder zufällig auf Mutter- und Tochterzelle verteilt. Die M-Phase (Mitose) lässt sich weiter gliedern in: Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase. In der Prophase findet eine Chromosomenkondensation statt. Im Gegensatz zu anderen Eukaryonten kommt es bei der Hefe nicht zu einer Auflösung der Kernhülle. Diesen besonderen Fall bezeichnet man als Endomitose. Ebenso bleibt in *S. cerevisiae* während der Kernteilung der Nukleolus erhalten. In der Metaphase werden die kondensierten Chromosomen an die Kinetochor-Mikrotubuli angeheftet, die die Schwesterchromatiden mit den entgegengesetzten Polen der mitotischen Spindel verbinden. Eine Metaphase-Platte bildet sich in Hefe nicht aus [Guacci *et al.* 1994, Straight *et al.* 1997]. Durch den Verlust der Chromosomenkohäsion wird die Anaphase eingeleitet und es kommt zur Trennung der Schwesterchromatiden [Cohen-Fix & Koshland 1997]. In der folgenden Telophase erfolgt die Depolymerisation der getrennten Chromosomen und die Einleitung der Zytokinese, mit der der Zellteilungszyklus endet und die Mutter- und neu entstandene Tochterzelle eine weitere Teilungsrunde starten können.

3.2.3 Regulation des Zellteilungszyklus durch zyklinabhängige Kinasen

In der Bäckerhefe *S. cerevisiae* ist die Vollendung eines Zellzyklus Ereignisses in einer bestimmten Phase essentiell für den Übergang zur nächsten Zellzyklus Phase [Hartwell & Weinert 1989]. Für einen korrekten Ablauf der einzelnen Zellzyklus Phasen sorgen zyklinabhängige Kinasen (CDKs- *cyclin dependnet kinases*) [Morgan 1997], die ihre Substrate an einem S/T-P Motive phosphorylieren. Bereits der Name der CDKs weist darauf hin, dass für ihre enzymatische Aktivität eine regulatorische Untereinheit, ein Zyklin, benötigt wird. Zykline erhielten aufgrund ihrer periodischen Schwankungen während des Zellzyklus ihren Namen [Evans *et al.* 1983]. Neben der Aktivierung der CDKs, verleihen sie ihnen Spezifität. In den meisten Fällen wird für die volle CDK Aktivität die Phosphorylierung eines Threonin Rests in der Nähe des aktiven Zentrums benötigt, was durch so genannte CAKs

(*CDK activating kinases*) katalysiert wird. Negativ regulatorisch wirken CKIs (*CDK inhibitors*), die an einen Komplex aus Zyklin und CDK binden und diesen inhibieren. Die inhibitorische Tyrosinphosphorylierung ist eine weitere Möglichkeit, um CDKs negativ zu beeinflussen. Sie wird in der Bäckerhefe von Swe1 vermittelt und stellt einen wichtigen Regulationsmechanismus für den Übergang zur M-Phase dar.

In *S. cerevisiae* ist die zyklinabhängige Kinase Cdc28 der Hauptregulator des Zellteilungszyklus [Mendenhall & Hodge 1998]. Cdc28 kann in Kombination mit den G1-Zyklinen Cln 1-3, den S-Phase Zyklinen Clb 5 und 6 oder den M-Phase Zyklinen Clb 1-4 vorkommen und auf diese Weise den G1/S Übergang bzw. den G2/M Übergang steuern [Nasmyth 1996]. Das G1-Zyklin Cln3 in Verbindung mit Cdc28 phosphoryliert den Transkriptionsinhibitor Whi5, was dessen Inhibition bewirkt, wodurch die Transkription der START-spezifischen Gene *CLN1*, 2 und *CLB5*, 6 ermöglicht wird [Costanzo *et al.* 2004]. Die Aktivität von Cln1,2/Cdc28 bewirkt die Initiierung der Knospenbildung, die Verdopplung der Spindelpolkörper, aktiviert die Proteolyse des Clb/CDK-Inhibitors Sic1 und inaktiviert die Proteolyse der Clb-Zykline, was letztendlich die Aktivierung der Clb5,6/CDK-abhängigen DNA-Replikation zur Folge hat [Schwob *et al.* 1994, Nash *et al.* 2001]. Die mitotischen Clb1-4/CDK Komplexe sind verantwortlich für die Ausbildung und Elongation der mitotischen Spindel, die Anheftung der Schwester-Chromatiden an eben dieser und die anschließende Chromosomentrennung. Die Cdc14-abhängige Degradation der mitotischen Zykline und die Akkumulation des Clb/CDK Inhibitors Sic1 in der Anaphase führt zum Austritt der Zelle aus der Mitose und zur Zytokinese. Cdc14 ist eine CDK-antagonistische Phosphatase und stellt in *S. cerevisiae* die zentrale Komponente für den Austritt aus der Mitose dar (Kapitel 3.3).

3.2.4 Regulation des Zellteilungszyklus durch Proteinabbau

Neben der transkriptionellen Kontrolle der Zykline und einiger anderer Zellzyklusregulatoren spielt deren ubiquitinvermittelte Degradation eine entscheidende Rolle, um ihr koordiniertes Auftreten zu gewährleisten, so dass ein geregelter Ablauf der Zellteilung stattfinden kann [Jorgensen & Tyers 1999]. Innerhalb der ubiquitinvermittelten Degradation wird das hoch konservierte Protein Ubiquitin als Kette von mindestens vier Untereinheiten über eine Enzymkaskade $E1 \rightarrow E2 \rightarrow E3$ auf das Substrat übertragen, so dass eine Polyubiquitinkette entsteht, die zur Erkennung und Abbau des jeweiligen Proteins über das 26S Proteasom führt [Hershko & Ciechanover 1998, Miller & Gordon 2005]. Die Substratspezifität wird durch die Ubiquitinligase E3 gewährleistet. Innerhalb des Zellteilungszyklus gibt es zwei Ubiquitinligase

Komplexe von entscheidender regulatorischer Bedeutung, der SCF (Skip1/Cullin/F-Box Protein) und der APC/C (*anaphase promoting complex* oder *cyclosome*) [Peters 1998].

Der SCF Komplex in Zusammenhang mit verschiedenen Substraterkennungsfaktoren (Cdc4, Grr1) katalysiert die Ubiquitinierung von G1-Zyklinen und CDK Inhibitoren wie z. B. Sic1, was den G1/S Übergang steuert. Die SCF Aktivität wird durch die Phosphorylierung der Zielproteine von Cln/CDK-Komplexen reguliert, da der SCF während des gesamten Zellzyklus aktiv ist [Cardozo & Pagano 2004].

Der APC als weitere wichtige Ubiquitinligase ist hauptsächlich während der M-Phase aktiv. In diesem Fall erfolgt die Regulation der Aktivität über die Bindung aktivierender Untereinheiten, Cdc20 und Hct1/Cdh1 [Schwab *et al.* 1997, Visintin *et al.* 1997, Peters 2006]. Cdc20 und Hct1 gehören zu der WD40-Proteinfamilie, sie besitzen so genannte WD40 Wiederholungseinheiten, die Protein-Protein Wechselwirkungen vermitteln können. Die Zielproteine des APC weisen entweder eine D-Box (*destruction box*) oder eine KEN-Box oder beide Motive auf. Diese Motive sind in den meisten Fällen jedoch nicht hinreichend für eine APC-vermittelte Proteolyse. Cdc20 ist ein instabiles Protein und aktiviert den APC am Metaphase-Anaphase Übergang. Es ist in der Lage an den durch Polo-Kinasen oder CDKs phosphorylierten APC zu binden. Pds1 und Clb5 sind bekannte APC/CDC20 Substrate [Shirayama *et al.* 1999]. Durch den Abbau von Pds1 (Securin), dem Inhibitor der Protease Esp1 (Separase), die zur Proteolyse der Cohesinuntereinheit Scc1 beiträgt, wird die Trennung der Schwester-Chromatiden initiiert und durch die Degradation des mitotischen Zyklins Clb5 leitet Cdc20 den Austritt aus der Mitose ein und ermöglicht so ein weiteres Fortschreiten im Zellteilungszyklus. Die Proteinmenge von Hct1 ist während des gesamten Zellteilungszyklus konstant. Im Unterschied zu Cdc20 muss der APC nicht phosphoryliert sein, um eine Bindung von Hct1 zu gewährleisten. Demgegenüber wird durch die Phosphorylierung von Hct1 eine Bindung mit dem APC unterdrückt. Eine Dephosphorylierung durch die Phosphatase Cdc14 und eine daraus resultierende Bindung an den APC findet in der Anaphase statt [Jaspersen 1999]. APC/Hct1 führt zum Abbau von Spo12 und Cdc5, Komponenten des FEAR und des mitotischen Zyklins Clb2 [Schwab *et al.* 1997, Charles *et al.* 1998], was den Austritt der Zelle aus der Mitose zur Folge hat. Weitere Hct1 Substrate sind das Spindelprotein Ase1 und das Motorprotein Cin8 [Juang *et al.* 1997, Harper *et al.* 2002]. Die APC/Hct1 Aktivität bleibt auch in der G1-Phase erhalten, bis die Zelle in einen neuen Zellteilungszyklus eintritt.

3.3 Der Austritt aus der Mitose

Der Zelle ist es nur möglich aus der Mitose auszutreten, wenn mitotische Zyklone APC-abhängig ubiquitiniert und am 26S Proteasom degradiert werden und Sic1, ein CDK Inhibitor, akkumuliert. Diese Ereignisse am Ende des Zellteilungszyklus, nach der Einleitung der Trennung der Schwester-Chromatiden werden durch die Phosphatase Cdc14 vermittelt. Außerdem tragen zusätzliche Funktionen dieser Phosphatase dazu bei, dass weitere Anaphase Ereignisse eingeleitet werden, um einen korrekten Ablauf dieser Phase zu gewährleisten und damit die Zelle auf einen erfolgreichen Austritt aus der Mitose und die Zytokinese vorzubereiten.

3.3.1 Die Phosphatase Cdc14

Das Gen, das für Cdc14 codiert, wurde erstmals in den siebziger Jahren von Hartwell durch Mutationsanalysen einer großen Zahl von *CDC*-Genen (Kapitel 3.2.1) identifiziert. Ausgehend von diesen Analysen wurde *CDC14* als ein essentielles Gen beschrieben, das notwendig ist für späte Ereignisse innerhalb des Zellteilungszyklus. Konditionale *cdc14* Mutanten arretieren als Zellen, die eine große Knospe aufweisen und zwei getrennte Kerne besitzen (Anaphase Arrest). Mittlerweile konnte Cdc14 und seine zellulären Funktionen genauer beschrieben werden. Cdc14 aus *S. cerevisiae* ist eine 551 Aminosäure (61,9 kDa) lange Ser/Thr Phosphatase [Wan *et al.* 1992], wobei die Cdc14 Funktionen innerhalb des Zellteilungszyklus abhängig sind von seiner Phosphatase Aktivität [Taylor *et al.* 1997]. Zu Cdc14 homologe Phosphatasen, die der Familie der Ser/Thr Phosphatasen angehören, sind inzwischen auch in anderen eukaryontischen Organismen bekannt. Sie weisen alle eine am N-Terminus lokalisierte konservierte Sequenz von circa 350 Aminosäuren auf, innerhalb derer das konservierte Phosphatase Motiv liegt [Gray *et al.* 2003]. Trotz der Sequenzähnlichkeiten, variieren die Funktionen der Cdc14-ähnlichen Proteine zwischen den unterschiedlichen Spezies [Trautmann *et al.* 2002] (Kapitel 3.3.11).

Cdc14 der Bäckerhefe *S. cerevisiae* wird während der meisten Zeit des Zellzyklus durch das multifunktionelle Protein Net1 im Nukleolus verankert und inhibiert [Shou *et al.* 1999, Visintin *et al.* 1999] (Kapitel 3.3.2.2). Die Freisetzung von Cdc14 in der Anaphase erfolgt durch zwei verschiedene Signalwege FEAR (*Cdc fourteen early anaphase release*) [Stegmeier *et al.* 2002, Stegmeier *et al.* 2004] und MEN (*mitotic exit network*) [Jaspersen *et al.* 1998, Geymonat *et al.* 2002] (Kapitel 3.3.3-3.3.9). Wird Cdc14 freigesetzt, hat dies zugleich eine Aktivierung der Phosphatase zur Folge, so dass sie multiple Anaphase Ereignisse auslösen kann. Cdc14 trägt zur Regulation der Mikrotubuli-Kräfte und

Spindelstabilisierung bei, zur Einleitung der rDNA Trennung sowie zum Austritt der Zelle aus der Mitose und anschließender Zytokinese [D'Amours & Amon 2004, Stegmeier & Amon 2004]. In *S. cerevisiae* ist der Austritt aus der Mitose ein essentieller Prozess. Die Freisetzung und Aktivierung von Cdc14 von seinem nukleolaren Inhibitor Net1 in der Anaphase führt zur Degradation mitotischer Zyklone, vor allem Clb2 und zur Inhibition mitotischer Zyklin/CDK Komplexe, was eine Aktivitätsabnahme dieser Komplexe zur Folge hat (Abbildung 3.2). Phosphorylierungsereignisse der zyklinabhängigen Kinase Cdc28 können somit durch die Phosphatase Aktivität von Cdc14 revidiert werden [Visintin *et al.* 1998]. Dies macht Cdc14 zu einem Gegenspieler von Cdc28 (Kapitel 3.3.8.1).

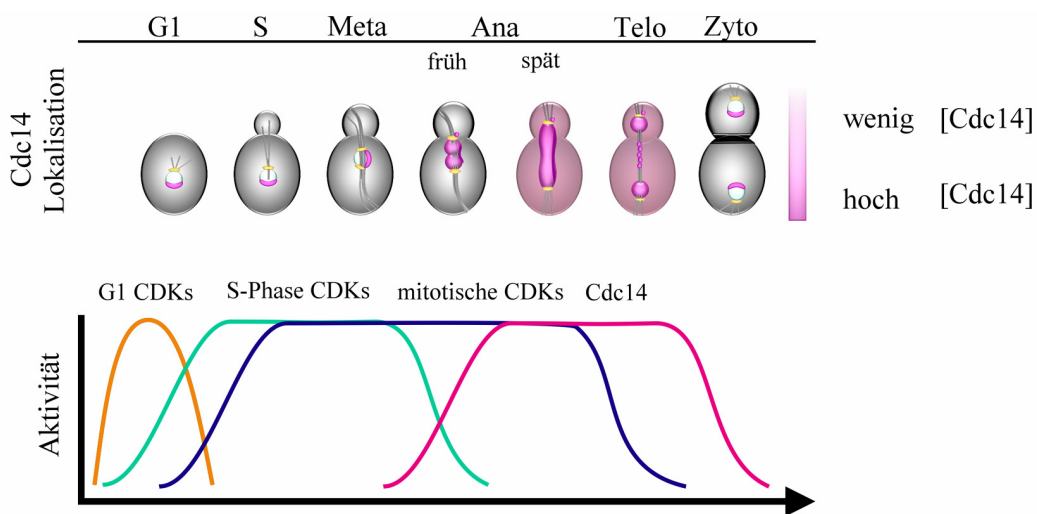


Abbildung 3.2: Lokalisation und Aktivität der Phosphatase Cdc14 während des Zellteilungszyklus in *S. cerevisiae* [verändert nach D'Amours & Amon 2004]

Die Aktivität der Phosphatase Cdc14 ist während des Zellteilungszyklus der Hefe *S. cerevisiae* auf die Anaphase beschränkt und in der Lokalisation der Phosphatase begründet. Durch die Verankerung von Cdc14 im Nukleolus wird die Phosphatase Aktivität dieses Proteins inhibiert. Zu Beginn der Anaphase wird Cdc14 aus dem Nukleolus freigesetzt und somit aktiviert. Mit steigender Zunahme der Cdc14 Aktivität, nimmt die Aktivität mitotischer CDKs ab. Als Folge davon können Phosphorylierungsereignisse der zyklinabhängigen Kinase Cdc28 durch Cdc14 umgekehrt werden. Die Zelle wird somit auf ihren Austritt aus der Mitose vorbereitet.

3.3.2 Die Inhibition der Phosphatase Cdc14

Die Inhibition der Aktivität von Cdc14 wird durch die Net1-abhängige Verankerung innerhalb einer Substruktur des Zellkerns, dem Nukleolus, gewährleistet. Somit kommt dem Nukleolus nicht nur eine Bedeutung bei der Ribosomenbiogenese zu sondern auch innerhalb der Regulation der Mitose, was ihn zum Gegenstand verschiedener Forschungsprojekte macht.

3.3.2.1 Struktur des Nukleolus und Anordnung der rDNA

Der Nukleolus ist eine Substruktur des Zellkerns, in der die rRNA Synthese und die Ribosomenassemblierung stattfinden [Tschochner & Hurt 2003]. Die ribosomale DNA (rDNA) der Hefe *S. cerevisiae* ist eine Region von circa 1-2 Mb auf dem rechten Arm des Chromosoms XII, die 100-200 Tandem Wiederholungen eines 9,1 kb großen rDNA Bereichs umfasst [Petes & Botstein 1977]. Jede Wiederholung enthält Gene, die für die 5S, 5,8S, 25S und 18S rRNAs codieren als auch Spacer Regionen. Es gibt die ITS1 und 2 (*internal transcribed spacer*), die 5' ETS und 3'ETS (*external transcribed spacer*) und die NTS1 und 2 (*nontranscribed spacer*) (Abbildung 3.3). Gene, die für die 5,8S, 25S und 18S rRNA codieren, werden von der RNA Polymerase I transkribiert, wobei die Transkription an der 5'ETS startet und an der 3'ETS endet, so dass ein 35S Primärtranskript entsteht. Die 5S rRNA wird von der RNA Polymerase III transkribiert. Um Rekombination an diesem großen, repetitiven Gen Locus gering zu halten und die Transkription durch die RNA Polymerase II zu verhindern, findet nukleolares *silencing* statt (Kapitel 3.3.2.2).

Das Erscheinungsbild der Nukleoli variiert stark in Abhängigkeit vom Zelltyp. Die rDNA humaner Zellen ist auf fünf verschiedene Chromosomen verteilt, was deren Organisation erschwert. In *S. cerevisiae* erscheint der Nukleolus als halbmondförmige Struktur, die direkt neben dem Zellkern zu liegen scheint [Carmo-Fonesca *et al.* 2000]. Während der Mitose bleibt er intakt und wird entlang der mitotischen Spindel aufgetrennt. Die Nukleoli höherer Eukaryonten erscheinen meist als kugelförmige Gebilde [Shaw & Doonan 2005], die aus drei Hauptkomponenten, dem fibrillären Zentrum, dem dichten fibrillären Zentrum und der granulären Komponente bestehen und deren Organisation sich während der Mitose auflöst. Léger-Silvestre *et al.* 1999 konnte zeigen, dass auch der Nukleolus von *S. cerevisiae* Subkompartimente ähnlich denen höherer Organismen aufweist.

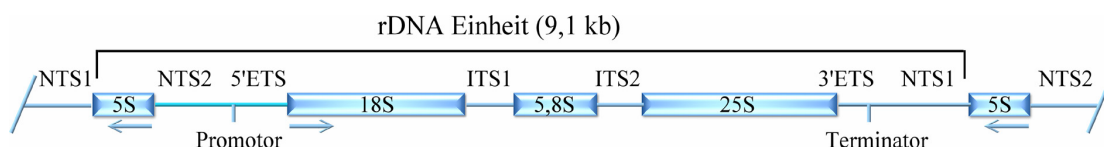


Abbildung 3.3: Die Organisation der rDNA – eine rDNA-Einheit

100-200 Wiederholungen einer solchen rDNA Einheit liegen auf dem langen Arm des Chromosom XII. Jede Wiederholung enthält Gene, die für die 5S, 5,8S, 25S und 18S rRNAs codieren als auch die Spacer Regionen NTS1, NTS2, 5'ETS, 3'ETS, ITS1 und ITS2.

3.3.2.2 Net1 - Inhibitor von Cdc14, Sir2-Verankerung, nukleolare Strukturkomponente

Net1, auch als Cfi1 und Ecs5 bekannt, ist ein 1189 Aminosäure großes Strukturprotein des Nukleolus und stellt die Hauptkomponente des so genannten RENT-Komplexes (*regulator of nucleolar silencing and telophase*) dar (Abbildung 3.4). Die Funktionen des RENT-Komplexes liegen in der Cdc14 Regulation während der Mitose [Shou *et al.* 1999] und der Bindung von Sir2 an die rDNA [de Almeida *et al.* 1999, Straight *et al.* 1999]. Durch die Verankerung von Cdc14 im Nukleolus wird die Aktivität dieses Proteins reguliert. Die Net1 Bindungsstelle für die Phosphatase liegt innerhalb des konservierten N-Terminus von Cdc14 im Bereich des katalytischen Zentrums (AS 279-291) [Traverso *et al.* 2001]. Net1 trägt also nicht nur zur Lokalisation der Phosphatase Cdc14 bei sondern auch zu deren Inhibition, wobei die ersten 341 Aminosäuren von Net1 notwendig und hinreichend sind für eine Interaktion mit Cdc14 [Traverso *et al.* 2001]. Die Phosphorylierung von Net1 zu Beginn der Anaphase bewirkt die Freisetzung und Aktivierung der Phosphatase Cdc14 (Kapitel 3.3.5) [Shou *et al.* 2002, Azzam *et al.* 2004]. Aufgrund der Inhibition von Cdc14 durch Net1 ist eine Überexpression von *NET1* toxisch für die Zellen, die daraufhin in der späten Anaphase bzw. frühen Telophase arretieren [Visintin *et al.* 1999].

Durch das über Net1 gebundene Sir2, eine Histon-Deacetylase, werden Rekombinationsereignisse an der rDNA unterdrückt [Gottlieb & Esposito 1989] und rDNA-*silencing* vermittelt, was die RNA Polymerase II-abhängige Transkription verhindert [Smith & Boeke 1997]. Die Inhibition von Rekombinationereignissen zwischen den rDNA Wiederholungen ist notwendig, um die Entstehung kleiner zirkulärer DNA-Fragmente zu verhindern, die sich beschleunigend auf die Zellalterung auswirken [Sinclair & Guarente 1997]. Die Inhibition der rDNA Rekombination und das rDNA-*silencing* werden wahrscheinlich durch eine Konformationsänderung in der rDNA beeinflusst, die durch die Histon-Deacetylase Aktivität von Sir2 hervorgerufen werden könnte.

Der RENT-Komplex wird über Fob1 an die NTS1 Region der rDNA rekrutiert, wobei der N-terminale Teil von Net1 ausreichend ist für die Cdc14 und Fob1 Bindung [Traverso *et al.* 2001, Stegmeier *et al.* 2004]. Fob1 hilft die Cdc14 Dissoziation von Net1 zu verhindern [Stegmeier *et al.* 2004]. Es ist im Gegensatz zu Sir2 ein positiver Regulator der rDNA Rekombination. Fob1 blockiert das Voranschreiten der Replikationsgabel [Kobayashi & Horiuchi 1996], was zu Doppelstrangbrüchen führen kann und so Rekombinationsereignissen erzeugt. Durch die Interaktion von Fob1 mit dem nukleolaren Protein Tof2 werden zusätzlich zu Sir2 weitere negative Regulatoren der Rekombination, Lrs4 und Csm1, an die NTS1 Region der rDNA rekrutiert [Huang *et al.* 2006] (Kapitel 3.4).

Außerdem ist der RENT-Komplex mit einer rDNA Region assoziiert, die circa 1,5-2 kb der NTS2 Region und der 35S rRNA codierenden Sequenz umfasst [Huang & Moazed 2003]. Die Bindung an diese rDNA Region ist Fob1 unabhängig. Ein möglicher Kandidat für die Rekrutierung des RENT-Komplexes an diese Region könnte die RNA Polymerase I und/oder assoziierte Transkriptionsfaktoren sein [Huang & Moazed 2003]. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass Net1 mit der RNA Polymerase I *in vivo* und *in vitro* interagiert und deren Aktivität *in vitro* stimuliert [Shou *et al.* 2001]. Zudem ist das rDNA-silencing unterdrückt in Zellen, die keine funktionelle RNA Polymerase I aufweisen [Buck *et al.* 2002]. Weiterhin stellt Net1 eine wichtige Strukturkomponente des Nukleolus dar. In *net1*-Deletionsmutanten, die im W303 Stammhintergrund der Hefe *S. cerevisiae* lebensfähig sind, ist die nukleolare Struktur zerstört. Nukleolare Protein, die nicht direkt über Net1 im Nukleolus verankert sind wie Nop1 und Nop2 sind delokalisiert [Shou *et al.* 2001].

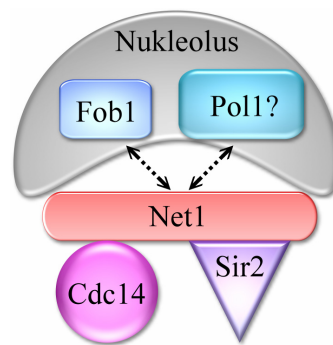


Abbildung 3.4: Eine schematische Darstellung des RENT-Komplexes und seiner nukleolaren Verankerung [verändert nach Shou *et al.* 1999]

Net1 stellt die Hauptkomponente des RENT-Komplexes dar. Neben Cdc14 ist auch Sir2, eine Komponente des nukleolaren silencing, an Net1 gebunden. Die Bindung des RENT an die NTS1 Region der rDNA erfolgt über Fob1, während die Interaktion mit Teilen der NTS2 Region und der für die 35S rRNA codierenden Sequenz evtl. über die RNA Polymerase I bewerkstelligt werden könnte.

3.3.3 Die Aktivierung der Phosphatase Cdc14 – FEAR und MEN

Die beiden regulatorischen Netzwerke FEAR und MEN steuern die Verankerung von Cdc14 im Nukleolus [Jaspersen *et al.* 1998, Shou *et al.* 1999, Geymonat *et al.* 2002, Stegmeier *et al.* 2002, Stegmeier *et al.* 2004]. Die FEAR (*Cdc fourteen early anaphase release*) Signalkaskade wird während des Metaphase-Anaphase Übergangs aktiviert, was eine Cdc14 Freisetzung in geringer Konzentration zur Folge hat. Abhängig von der FEAR Signalkaskade lokalisiert Cdc14 in der frühen Anaphase nicht mehr im Nukleolus sondern im Zellkern. Im Gegensatz dazu gewährleistet das *mitotic exit network* (MEN) die Entlassung von Cdc14 aus

dem Nukleolus erst später innerhalb der Anaphase. Das *mitotic exit network* trägt dazu bei, dass Cdc14 in hoher Konzentration freigesetzt wird und in der späten Anaphase im Zellkern und dem Zytoplasma lokalisiert. Der Kernexport von Cdc14 wird in einer Crm1-abhängigen Weise gewährleistet, das physikalisch mit einem Leucin-reichen Kernexportsignal am C-Terminus von Cdc14 interagiert [Bembenek *et al.* 2005]. Die hohe Cdc14 Aktivität während der späten Anaphase ist notwendig, um Bedingungen für einen Austritt der Zelle aus der Mitose zu schaffen. Temperatursensitive Mutanten, die Defekte in einer MEN Komponente zeigen, arretieren in der späten Anaphase/frühen Telophase mit einer beträchtlichen Aktivität von mitotischen Zyklin/CDK Komplexen [Jaspersen *et al.* 1998].

Demgegenüber ist das FEAR Netzwerk nicht essentiell für einen Austritt der Zellen aus der Mitose. Mutationen innerhalb von FEAR Komponenten führen zu keinem Arrest in der Anaphase. Frühe Anaphase-Ereignisse laufen zwar verzögert ab, können jedoch durch das in der späten Anaphase freigesetzte Cdc14 vermittelt werden.

Die FEAR Signalkaskade und das *mitotic exit network* werden in den Kapiteln 3.3.4 bis 3.3.9 genauer beschrieben.

3.3.4 Das FEAR Netzwerk

Gegenwärtig sind fünf Komponenten der FEAR Signalkaskade bekannt. Positive Regulatoren des FEAR sind die Protease Esp1 (Separase), das Kinetochor Protein Slk19, das kleine nukleolare Protein Spo12 und die Polo-Kinase Cdc5 [Stegmeier *et al.* 2002, Visintin *et al.* 2003]. Im Gegensatz dazu sind Pds1 und das nukleolare Fob1, ein blockierendes Protein für das Fortschreiten der Replikationsgabel, inhibitorische Regulatoren des FEAR [Cohen-Fix & Koshland 1999, Sullivan & Uhlmann 2003, Stegmeier *et al.* 2004] (Abbildung 3.5 in Kapitel 3.3.9).

Die Separase Esp1 ist eine Protease. Sie wird in der späten Metaphase durch den Abbau ihres Inhibitors Pds1 aktiviert. Die aktive Separase spaltet eine Untereinheit des Cohesins (Scc1), das die Schwester-Chromatiden zusammenhält, was zu deren Trennung führt [Uhlmann *et al.* 2000, Uhlmann 2001, Nasmyth 2001]. Ein weiteres Substrat der Separase ist Slk19, das im Gegensatz zu Scc1 durch die Esp1 Proteolyse stabilisiert wird, da die Spaltung ein aminoterminaleres Serin freilegt (N-End-Regel) [Pellman & Christman 2001]. Slk19 lokalisiert während der Metaphase an den Kinetochoren. Nach der Spaltung und Stabilisierung durch die Separase, lokalisiert Slk19 in Abhängigkeit von Esp1 am Mittelteil der Spindel (*spindle midzone*) und trägt dort zu deren Stabilisierung bei [Zeng *et al.* 1999, Sullivan *et al.* 2001]. Zellen, in denen *SLK19* deletiert ist, zeigen extrem kurze mitotische Spindeln und eine

erhöhte Anzahl an zytoplasmatischen Mikrotubuli [Zeng *et al.* 1999]. Die Slk19 Spaltung durch die Separase und seine Lokalisation an der *spindle midzone* hat keine Funktion in der Freisetzung von Cdc14 innerhalb des FEAR. Diese wird durch eine nicht-proteolytische Esp1 Funktion vermittelt [Sullivan & Uhlmann 2003].

Das kleine Phosphoprotein Spo12 lokalisiert im Nukleolus und weist ein hochkonserviertes Sequenzmotiv von 20 Aminosäuren auf [Grether & Herskowitz 1999, Shah *et al.* 2001]. Spo12 bindet an einen Inhibitor des FEAR Netzwerks, Fob1, der die Cdc14 Freisetzung von Net1 blockiert. Durch die Phosphorylierung von Spo12 während der frühen Anaphase wird eine Konformationsänderung innerhalb des Spo12/Fob1 Komplexes hervorgerufen, die dazu führt, dass die inhibitorische Wirkung von Fob1 auf die Cdc14 Freisetzung aufgehoben wird [Stegmeier *et al.* 2004].

Die Polo-Kinase Cdc5 stellt ein Bindeglied zwischen FEAR und MEN dar. Neben der Cdc5-abhängigen Phosphorylierung von Scc1, was die Proteolyse durch Esp1 erleichtert [Alexandru *et al.* 2001], phosphoryliert die Polo-Kinase Lte1 und Bfa1, Komponenten des MEN Signalwegs [Hu *et al.* 2001, Lee *et al.* 2001], was eine Aktivierung von Tem1 und damit des MEN zur Folge hat. Verschiedene Publikationen konnten zeigen, dass eine Phosphorylierung von Net1 durch Cdc5 die Freisetzung von Cdc14 bedingt [Shou *et al.* 2002, Yoshida & Toh-e 2002, Visintin *et al.* 2003]. Jüngste Daten befürworten jedoch eher eine CDK-abhängige Net1 Phosphorylierung [Azzam *et al.* 2004] (Kapitel 3.3.5).

Genetische Studien [Visintin *et al.* 2003, Sullivan & Uhlmann 2003] weisen darauf hin, dass die Komponenten des FEAR in zwei parallelen Ästen organisiert sind, wobei ein Ast Spo12 und Fob1 und der andere Esp1, Slk19 und Cdc5 enthalten könnte (Abbildung 3.5 in Kapitel 3.3.9). Esp1 als eine Komponente des FEAR stellt sicher, dass die Chromosomentrennung eingeleitet ist, bevor die Cdc14 Freisetzung initiiert wird. Mit dem parallelen Ast aus Spo12, wird verhindert, dass ausschließlich die Separase für die Aktivierung von Cdc14 verantwortlich ist, was einen vorzeitigen Austritt der Zellen aus der Mitose verhindern soll. Damit könnte dem FEAR Netzwerk die Bedeutung eines zeitlichen Puffers zwischen der Chromosomentrennung und dem Austritt der Zelle aus der Mitose zukommen [D'Amours & Amon 2004].

3.3.5 Molekulare Mechanismen der Cdc14-Freisetzung

Net1 und Cdc14 werden *in vivo* phosphoryliert [Visintin *et al.* 2003]. Vermutlich ist die Phosphorylierung von Net1 nicht aber die von Cdc14 ausschlaggebend für die Freisetzung der Phosphatase [Shou *et al.* 2002]. In einer Publikation von Shou *et al.* 2002 wird vorgeschlagen,

dass die Polo-Kinase Cdc5 verantwortlich ist für die Hyperphosphorylierung von Net1 in der frühen Anaphase. Eine Überexpression von Cdc5 induziert eine frühzeitige Cdc14 Freisetzung in Zellen mit kurzen Spindeln [Shou *et al.* 2002] und induziert eine Phosphorylierung von Cdc14 und Net1 *in vivo* [Visintin *et al.* 2003]. Außerdem phosphoryliert Cdc5 beide Proteine *in vitro*, was zu einer Dissoziation der Net1-Cdc14 Interaktion führt [Shou *et al.* 2002]. Demgegenüber steht eine Publikation von Azzam *et al.* 2004, die die Phosphorylierung von Net1 durch mitotische CDKs vorschlägt. Zum einen weisen die Phosphorylierungsstellen, die wichtig sind für die Cdc14 Dissoziation von seinem Inhibitor Net1, das CDK Konsensus Motiv S/T-P auf und zum anderen bewirkt die Mutation dieser Phosphorylierungsstellen eine verzögerte und unvollständige Freisetzung von Cdc14 [Azzam *et al.* 2004]. Im Gegensatz dazu hat die Mutation möglicher Cdc5 Phosphorylierungsstellen von Net1 keinen Einfluss auf die Freisetzung der Phosphatase *in vivo* [Shou *et al.* 2002]. Mitotische CDKs sind jedoch bereits vor der Anaphase vorhanden, so dass eine vorzeitige Freisetzung von Cdc14 verhindert werden muss. Eine Phosphorylierung von Net1 vor der Anaphase wird durch die Phosphatase PP2A^{Cdc55} inhibiert [Queralt *et al.* 2006]. Erst mit der Aktivierung des FEAR, wenn PP2A^{Cdc55} durch die Separase abgebaut wird, ist eine Phosphorylierung von Net1 durch mitotische CDKs möglich und Cdc14 kann freigesetzt werden. Da die Freisetzung von Cdc14 durch die Mutation der CDK-Phosphorylierungsstellen von Net1 nicht vollständig blockiert wird, könnte man sich eine weitere CDK-unabhängige Phosphorylierung von Net1 vorstellen oder ein Zusammenspiel aus einer CDK- und Cdc5-abhängigen Phosphorylierung von Net1 zur Entlassung von Cdc14 aus dem Nukleolus.

3.3.6 Funktionen des FEAR Netzwerk

Cdc14 freigesetzt durch das FEAR Netzwerk katalysiert in der frühen Anaphase multiple Ereignisse, die es der Zelle erlauben, erfolgreich diese Phase zu durchlaufen und letztendlich aus der Mitose auszutreten. Dazu gehören die Initiation des MEN, die Stabilisierung der Spindel, die Positionierung des Zellkerns und die Trennung der rDNA.

3.3.6.1 Initiierung des MEN

Zum einen trägt die Polo-Kinase Cdc5 durch Phosphorylierung der MEN-Komponenten Bfa1 und Lte1 zur Aktivierung von Tem1 und damit zur Initiierung des MEN bei (Kapitel 3.3.4 und 3.3.7). Zum anderen wirkt Cdc14, das innerhalb des FEAR freigesetzt wird durch die

Dephosphorylierung von Cdc15 positiv regulatorisch auf die Aktivierung des MEN. Zusätzlich wird ein negativer Regulator des MEN PP2A^{Cdc55} von der Separase Esp1 abgebaut [Queralt *et al.* 2006].

3.3.6.2 Die Stabilisierung der Anaphase-Spindel und Kernpositionierung

Metaphase Mikrotubuli zeigen eine hohe Dynamik, die notwendig ist, um die Anheftung an die Schwester-Chromatiden zu gewährleisten. Für eine korrekte Trennung der Chromosomen ist es jedoch notwendig, dass die Mikrotubuli Dynamik zu Beginn der Anaphase mit der Elongation der mitotischen Spindel abnimmt [Higuchi & Uhlmann 2005]. Außerdem ist der Mittelteil der mitotischen Spindel (*spindle midzone*) durch die schnelle Elongation äußerst fragil und muss stabilisiert werden. Durch die Dephosphorylierung von Sli15 durch Cdc14 lokalisiert der Ipl1-Sli15-Bir1 Komplex an der *spindle midzone* und trägt auf diese Weise zur Rekrutierung von Slk19 bei [Pereira & Schiebel 2003]. Weiterhin werden Ase1 ein konserviertes Mikrotubuli Protein und Fin1 durch Cdc14 dephosphoryliert und dadurch an der mitotischen Spindel lokalisiert [Khmelninskii *et al.* 2007, Woodbury & Morgan 2007]. Ase1 trägt zusammen mit Slk19 zu einem fokussierten und zentrierten Mittelteil der mitotischen Spindel bei. Zusätzlich wird die Abnahme der Mikrotubulidynamik durch die Cdc14-abhängige Dephosphorylierung von Ask1, Stu1 und Cin8 reguliert [Higuchi & Uhlmann 2005].

Das FEAR Netzwerk und die innerhalb dessen freigesetzte Phosphatase Cdc14 regulieren außerdem Kräfte, die von den zytoplasmatischen Mikrotubuli ausgehen, so dass eine korrekte Aufteilung der Schwester-Chromatiden in Tochter- und Mutterzelle stattfinden kann. Kar9, ein Mikrotubuli assoziiertes Protein, könnte ein mögliches Zielprotein der Phosphatase sein [D'Amours & Amon 2004]. Während der Metaphase lokalisiert Kar9 an dem Spindelpolkörper und den zytoplasmatischen Mikrotubuli, die zur Tochterzelle ausgerichtet sind, um die Spindel und somit den Zellkern zur Knospe hin zu positionieren [Liakopoulos *et al.* 2003, Maekawa *et al.* 2003]. Inwieweit die Phosphorylierung von Kar9 bei seiner asymmetrischer Lokalisation während der Metaphase eine Rolle spielt, ist umstritten [Liakopoulos *et al.* 2003, Maekawa & Schiebel 2004]. Zu Beginn der Anaphase ändert sich die Kar9 Lokalisation und eine verminderte Phosphorylierung des Proteins ist zu detektieren [Liakopoulos *et al.* 2003, Maekawa *et al.* 2003]. Im Gegensatz zu seiner Metaphase-Lokalisation an nur einem Spindelpol, der zur Tochterzelle orientiert ist, lokalisiert Kar9 in der frühen Anaphase an beiden Spindelpolen [Maekawa *et al.* 2003], so dass auf diese Kräfte einwirken, die eine symmetrische Verteilung der Schwester-Chromatiden auf Tochter- und

Mutterzelle zur Folge haben. Vor allem die Änderung im Phosphorylierungsmuster von Kar9 zu Beginn der Anaphase würde es zu einem geeigneten Substrat der Cdc14 Phosphatase machen. Es gibt jedoch noch weitere Motorproteine, die CDK-abhängig phosphoryliert werden und somit Zielproteine von Cdc14 darstellen könnten, um eine korrekte Positionierung des Zellkerns während der Anaphase zu gewährleisten [D'Amours & Amon 2004].

3.3.6.3 Die Trennung der rDNA

Bereits 1991 in einer Publikation von Granot & Snyder konnte gezeigt werden, dass die Trennung des Nukleolus ein Cdc14-abhängiger Prozess zu sein scheint.

Die Nukleolustrennung wird nicht wie der Rest des Genoms in der Metaphase eingeleitet sondern erst zu Beginn der Anaphase nach der Aktivierung der Phosphatase Cdc14. Für die Trennung der rDNA ist außer der Auflösung der Cohesin-abhängigen Kohäsion noch die Cdc14-abhängige Trennung der an diesem DNA Locus bestehenden Cohesin-unabhängigen Kohäsion notwendig. Durch das aktive Cdc14 zu Beginn der Anaphase wird der heteropentamere Condensin-Komplex an den rDNA Locus rekrutiert, um dessen Aufteilung auf Mutter- und Tochterzelle einzuleiten [D'Amours *et al.* 2004, Sullivan *et al.* 2004, Torres-Rosell *et al.* 2004, Wang *et al.* 2004]. Die rDNA Trennung gliedert sich in zwei Prozesse, die Kompaktierung des rDNA Locus und die Auflösung der Cohesin-unabhängigen Kohäsion an der rDNA [Machín *et al.* 2005, Sullivan *et al.* 2004]. Ohne Kompaktierung der 5 µm langen rDNA Schleife kann eine vollständige Trennung der rDNA in der 8-10 µm langen Hefe nicht stattfinden, wobei die Kondensation dieses Gen Locus in der Anaphase abhängig ist von Condensin und dem Ipl1-Sli15 Komplex [Lavoie *et al.* 2004, Sullivan *et al.* 2004]. Die Rate der Kompaktierung der rDNA in der Metaphase liegt bei 200 kb/µm und während der Anaphase erreicht sie 400-500 kb/µm [Sullivan *et al.* 2004]. Die letztendliche Auflösung der Cohesin-unabhängigen Kohäsion der rDNA ist abhängig von Condensin jedoch unabhängig von Ipl1-Sli15 [D'Amours *et al.* 2004, Sullivan *et al.* 2004, Wang *et al.* 2004]. Bei der Anreicherung von Condensin an der rDNA während der Anaphase scheint sein Sumoylierungszustand eine Rolle zu spielen. Vor dem Eintritt in die Mitose ist die Condensinuntereinheit Ycs4 monosumoyliert, aber zu Beginn der Anaphase ist Ycs4 disumoyliert. In *cdc14* Mutanten ist die Anaphase-spezifische sumoylierte Form der Condensinuntereinheit stark reduziert [D'Amours *et al.* 2004], was die Schlussfolgerung zulässt, dass die Sumoylierung von Condensin in Abhängigkeit von Cdc14 abläuft.

Sullivan *et al.* 2004 schlagen vor, dass neben Condensin die Aktivität der Topoisomerase II benötigt wird, um die an der rDNA bestehende Cohesin-unabhängige Kohäsion zu trennen, da in *top2* Mutanten der Nukleolus ungetrennt bleibt. D'Amours *et al.* 2004 schlossen eine Beteiligung der Topoisomerase II an der rDNA Trennung jedoch aus, da eine Überexpression von Cdc14 in *top2* Mutanten die Trennung der rDNA induzieren kann. Eine hohe Menge an Cdc14 unterdrückt also den Bedarf der Topoisomerase II an der rDNA Trennung.

Jüngste Studien weisen darauf hin, dass die Cohesin-unabhängige Kohäsion an der rDNA verursacht wird durch die hohe Transkriptionsrate dieses Locus [Machín *et al.* 2006, Tomson *et al.* 2006]. Die Reduktion der rDNA Transkription durch die Deletion von *NET1* oder die Inaktivierung der RNA Polymerase I führt zu einer Verminderung der rDNA Trennungsdefekte in *cdc14* Mutanten [Machín *et al.* 2006, Tomson *et al.* 2006]. Die rRNA Transkripte und/oder die an diesen assemblierten Faktoren könnten eine Kohäsion an den Genen der rDNA schaffen, die durch einen zusätzlichen Cohesin-unabhängigen Mechanismus gelöst werden muss [Tomson *et al.* 2006]. Die Publikation von Machín *et al.* 2006 beschreibt außerdem eine Funktion von Fob1 bei der Trennung der rDNA zusätzlich zu seiner FEAR und RFB (*replication fork block*) Funktion, da durch die Deletion von *FOB1* der Phänotyp einer *cdc14* Mutante verstärkt wird. Aufgrund einer Publikation von Johzuka *et al.* 2006 nach der Fob1 eine Rolle in der Rekrutierung von Condensin an die rDNA spielt, nehmen die Autoren einen Zusammenhang in der Fob1-abhängigen Bindung von Condensin an der rDNA und seiner Funktion in der rDNA Trennung an. Die genauen molekularen Mechanismen der rDNA Trennung müssen jedoch noch intensiver analysiert werden.

3.3.7 Das Mitotic Exit Network (MEN)

Der MEN Signalweg wird vermittelt durch das kleine G-Protein Tem1, das an die Protein Kinase Cdc15 bindet [Asakawa *et al.* 2001]. Cdc15 aktiviert im Anschluss den Dbf2-Mob1 Komplex [Mah *et al.* 2001], der die Freisetzung von Cdc14 aus dem Nukleolus auslöst (Abbildung 3.5 in Kapitel 3.3.9).

Tem1 ist eine kleine Ras-ähnliche GTPase, die vermutlich durch die Bindung von GTP aktiviert und durch den GAP-Komplex (GTPase activating protein) Bub2-Bfa1 inhibiert wird [Piatti *et al.* 2006]. Ein weiterer Inhibitor des MEN ist die Phosphatase PP2A^{Cdc55} [Wang & Ng 2006]. Positiv regulatorisch wirkt Lte1, das eine GEF (*g*uanine *n*ucleotide *e*xchange *f*actor) Domäne aufweist. Es konnte jedoch noch nicht geklärt werden, ob Lte1 als ein GEF für Tem1 wirkt [Simanis *et al.* 2003, Piatti *et al.* 2006]. FEAR Komponenten tragen zur Initiation des MEN bei. Esp1 katalysiert den Abbau von PP2A^{Cdc55} [Queralt *et al.* 2006]. Cdc5 aktiviert

Lte1 durch dessen Phosphorylierung und trägt durch die Phosphorylierung von Bfa1 zur Inaktivierung des Bfa1-Bub2 Komplexes bei [Hu *et al.* 2001, Lee *et al.* 2001]. Die Phosphorylierung von Bfa1 durch Cdc5 könnte durch den Abbau der Phosphatase PP2A^{Cdc55} durch die Separase zu Beginn der Anaphase noch zusätzlich positiv unterstützt werden [Queralto *et al.* 2006]. Dass der MEN Signalweg durch die Dephosphorylierung des Bfa1/Bub2 Komplexes durch die Phosphatase PP2A^{Cdc55} negativ reguliert wird, ist jedoch aufgrund des synthetischen Wachstumsdefekts, den die Doppelmutanten *cdc55-Δ bfa-1Δ* und *cdc55-Δ bfa1-Δ* zeigen, fraglich [Wang & Ng 2006]. Wang & Ng schlagen Tem1 als Zielprotein von PP2A^{Cdc55} vor, da *cdc55-Δ* Mutanten eine erhöhte Tem1 Phosphorylierung und MEN Aktivität zeigen.

Es gibt auch eine gewisse räumliche Kontrolle der Aktivität des MEN. Tem1 lokalisiert mit dem Bfa1-Bub2 Komplex an beiden Spindelpolen der mitotischen Spindel. Mit der Elongation der mitotischen Spindel verschwindet Bfa1-Bub2 jedoch von dem Spindelpol, der in der Mutterzelle verbleibt, somit wird ein zeitgemäßer Austritt der Zelle aus der Mitose eingeleitet [Molk *et al.* 2004, Fraschini *et al.* 2006]. Lte1 dagegen lokalisiert in der Tochterzelle, so dass es zu einer Aktivierung von Tem1 kommen kann, wenn der SPB während der Elongation der Spindel im Verlauf der Anaphase in die Tochterzelle eintritt [Bardin *et al.* 2000, Pereira *et al.* 2000]. Zu späteren Zeitpunkten der Anaphase verschwindet Bfa1-Bub2 dann auch vom Spindelpol in der Tochterzelle, was wahrscheinlich zu einer vollständigen Aktivierung von Tem1 beiträgt [Piatti *et al.* 2006]. Weiterhin reichert sich durch Cdc14 dephosphoryliertes Cdc15 am SPB in der Tochterzelle an, das bis zur Freisetzung von Cdc14 nur am SPB in der Mutterzelle lokalisiert war [Cenamor *et al.* 1999, Xu *et al.* 2000]. Auch Mob1 und Dbf2 sind während der Anaphase an den Spindelpolen lokalisiert.

3.3.8 Funktionen des MEN

Das *mitotic exit network* ist essentiell für einen erfolgreichen Austritt der Zellen aus der Mitose. Zudem wird in Abhängigkeit von verschiedenen MEN Komponenten und deren Änderung in ihrer Lokalisation am Ende der Anaphase die Zytokinese initiiert.

3.3.8.1 Die Inaktivierung zyklinabhängiger Kinasen

Damit ein Austritt aus der Mitose überhaupt möglich ist, muss der Hauptregulator der Mitose, in *S. cerevisiae* Cdc28 und seine regulatorischen Untereinheiten, die Zyklone inhibiert bzw. degradiert werden.

Am Ende der Mitose akkumuliert Sic1, ein CDK Inhibitor und der APC wird durch die Assoziation mit seinen regulatorischen Untereinheiten Cdc20 und Hct1 aktiviert [Schwab *et al.* 1997, Visintin *et al.* 1997], was den Abbau mitotischer Zyklone zur Folge hat. Maßgeblich verantwortlich dafür ist die Phosphatase Cdc14. Zum einen wird der Transkriptionsfaktor Swi5 dephosphoryliert, was dessen Transport in den Zellkern bewirkt [Nasmyth *et al.* 1990, Moll *et al.* 1991], so dass eine vermehrte Transkription von Sic1 stattfindet. Sic1 wird sofort nach seiner Produktion durch aktive Zyklin/CDK Komplexe phosphoryliert und somit für eine Ubiquitin-abhängige Degradation am SCF markiert [Skowrya *et al.* 1997]. Cdc14 dagegen bewirkt die Dephosphorylierung und damit Stabilisierung von Sic1. Zum anderen wird durch die Phosphataseaktivität von Cdc14 Hct1 und der APC/Hct1 Inhibitor Acm1 dephosphoryliert [Jaspersen 1999, Hall *et al.* 2008], was die Entstehung eines aktiven APC/Hct1 Komplex zur Folge hat, der den Abbau mitotischer Zyklone, vor allem Clb2 einleitet [Schwab *et al.* 1997]. Außerdem trägt die Phosphatase Aktivität von Cdc14 nicht nur zur Inhibition von Clb/CDK und dem Abbau mitotischer Zyklone bei, sondern revidiert auch Phosphorylierungsereignisse aktiver Zyklin/CDKs [Visintin *et al.* 1998].

3.3.8.2 Die Initiierung der Zytokinese

Verschiedene MEN Komponenten werden am Ende der Anaphase durch die Aktivität von Cdc14 dephosphoryliert, was eine Lokalisationsänderung mit sich bringt und somit einigen MEN-Komponenten eine Rolle in der Einleitung der Zytokinese zukommen lässt.

Eine Dephosphorylierung der Kinase Cdc15 führt beispielsweise zu einer Lokalisation an dem Spindelpol der Tochterzelle, was entscheidend ist für die Zelle, um Zytokinese durchzuführen, da die Expression einer nicht mehr korrekt an den Spindelpolen lokalisierenden *cdc15* Mutante nicht den Austritt aus der Mitose aber sehr wohl die Zytokinese verhindert [Menssen *et al.* 2001]. Weiterhin spielen auch Mob1, Dbf2, Cdc5 und Cdc14 eine Rolle in der Zytokinese, indem sie in der späten Anaphase am Mutter-Tochter-Übergang lokalisieren [Song *et al.* 2000, Luca *et al.* 2001, Song *et al.* 2001, Yoshida & Toh-e 2001, Bembenek *et al.* 2005]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Mob1-Dbf2 Komplex mit Cdc14 während der späten Anaphase im Zellkern lokalisiert unter anderem an den Kinetochoren, so dass durch die Regulation der Interaktion essentieller Kinetochor- oder

Spindel-assoziiierter Proteine die Disassemblierung der mitotischen Spindel und die Zytokinese kontrolliert wird [Stoepel *et al.* 2005].

3.3.9 Zusammenfassende Darstellung der Cdc14-Regulation über FEAR und MEN

Die Vorgänge der Cdc14 Freisetzung innerhalb des FEAR und MEN sind äußerst komplex, die Funktionen der Phosphatase vielfältig. Daher sind in der Abbildung 3.5 die beiden regulatorischen Netzwerke zur Aktivierung von Cdc14 und die Funktionen der Phosphatase noch einmal zusammenfassend dargestellt.

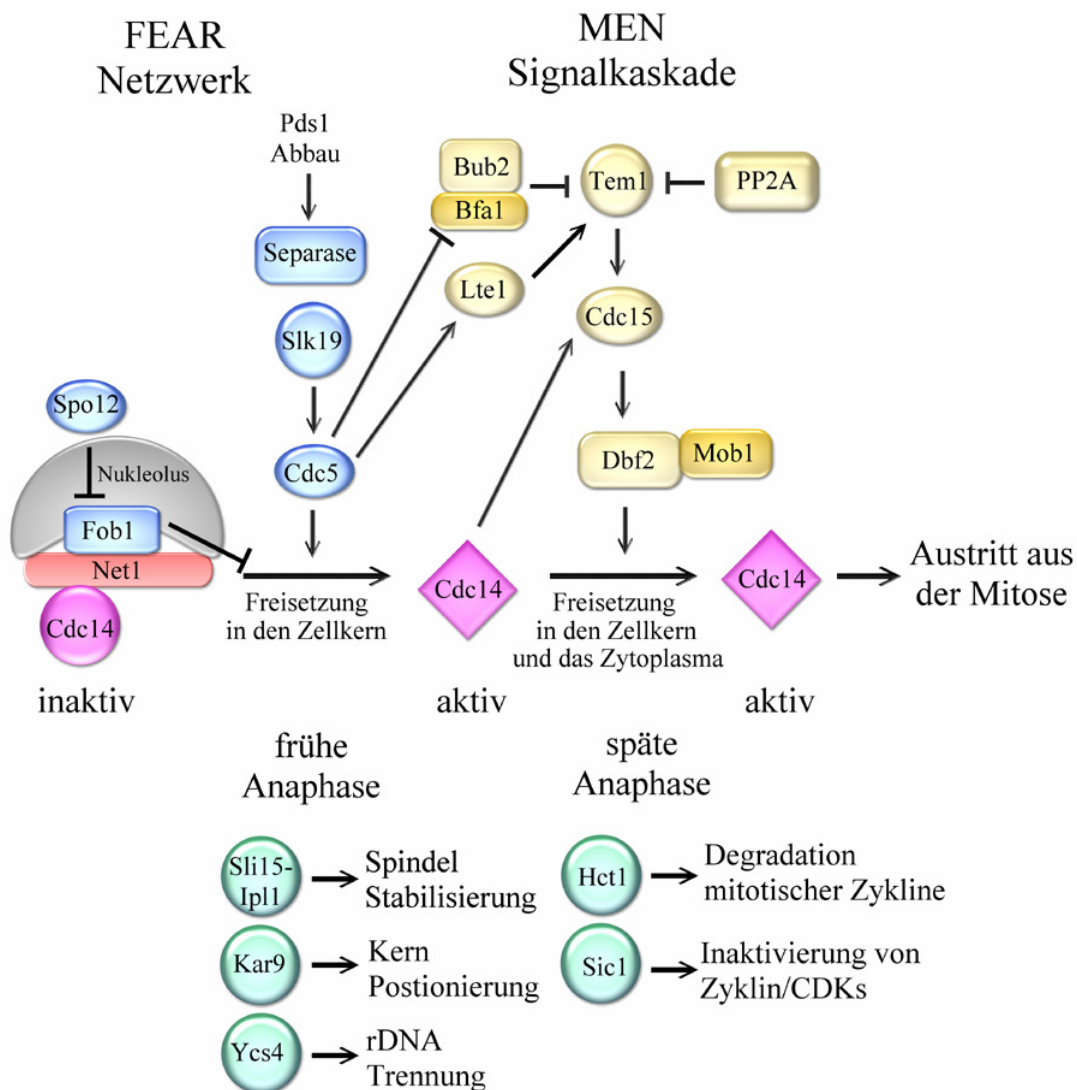


Abbildung 3.5: Die Cdc14-aktivierenden Signalkaskaden FEAR und MEN [verändert nach D'Amours & Amon 2004]

Die Komponenten des FEAR Signalwegs und des MEN bewirken eine Freisetzung der Phosphatase Cdc14 von ihrem Inhibitor Net1. Durch das FEAR Netzwerk wird Cdc14 in der frühen Anaphase aus dem Nukleolus freigesetzt und lokalisiert im Zellkern. Einige Zielproteine der Phosphatase in der frühen Anaphase, die zur

Spindelstabilisierung, Kernpositionierung und Trennung rDNA beitragen, sind beispielhaft aufgeführt. Innerhalb des MEN wird Cdc14 in größerer Menge freigesetzt und lokalisiert im Zellkern und Zytoplasma. Der Austritt der Zelle aus der Mitose wird vorbereitet und die Zellteilung initiiert. (Pfeile weisen auf eine stimulierende Wirkung hin, während die Linien mit einem senkrechten Strich eine Inhibition markieren.)

3.3.10 Die Inaktivierung von Cdc14 und das AMEN

Wurde der Austritt aus der Mitose und die Zytokinese vollzogen, müssen die Cdc14 bedingten Dephosphorylierungsereignisse abgeschaltet werden. Dabei leitet die Phosphatase selbst ihre eigene Inaktivierung ein. Durch die Cdc14 Aktivität wird der MEN Inhibitor Bfa1 dephosphoryliert und somit reaktiviert [Pereira *et al.* 2002]. Außerdem wird die Aktivität des FEAR Netzwerks herunterreguliert, indem der aktive APC/Hct1 Komplex, der am Ende der Mitose durch die Dephosphorylierung von Hct1 durch Cdc14 entsteht, zum Abbau von Spo12 und Cdc5 führt. Der Abbau von Cdc5, dem Bindeglied zwischen FEAR und MEN, führt nicht nur zu einer verminderten FEAR Aktivität sondern auch zu einer Schwächung der Signalgebung innerhalb des MEN. Dass die Degradation von Cdc5 hauptverantwortlich ist für die Inaktivierung der Cdc14 Freisetzung, zeigt die Expression einer stabilisierten Form von *CDC5*, die zu einer verzögerten Rückführung von Cdc14 in den Nukleolus führt [Visintin *et al.* 2008]. Des Weiteren kann das phosphorylierte Net1 durch Cdc14 dephosphoryliert werden, was die erneute Verankerung der Phosphatase Cdc14 im Nukleolus möglich macht [Shou *et al.* 1999]. Außerdem fördert Cdc14 die Produktion von Amn1, das an das kleine G-Protein Tem1 bindet und so dessen Wechselwirkung mit Cdc15 unterdrückt [Wang *et al.* 2003]. In diesem Zusammenhang spricht man von dem so genannten AMEN (*antagonist of MEN*) Netzwerk.

Durch die Inaktivierung von Cdc14 und der anschließenden Degradation von Amn1 durch den SCF-Komplex ist es der Zelle möglich, bei den entsprechenden äußeren Bedingungen in einen neuen Zellteilungszyklus einzutreten.

3.3.11 Funktionen von Cdc14 Homologen in anderen Organismen

Die dual-spezifische Phosphatase Cdc14 ist konserviert von der Hefe bis zu höheren eukaryontischen Organismen und zeigt eine Vielfalt an Funktionen während des Zellteilungszyklus in den verschiedenen Spezies [Trautmann & McCollum 2002].

Die Funktionen und Regulation der Phosphatase Cdc14 aus *S. cerevisiae* wurden in den Kapitel 3.3.1-3.3.9 beschrieben.

Das zu Cdc14 homologe Protein in *S. pombe* wird als Flp1/Clp1 bezeichnet. Es zeigt zu Cdc14 aus *S. cerevisiae* (ScCdc14) eine 36%-ige Sequenzidentität und kann ScCdc14

funktionell ersetzen [Kaiser *et al.* 2002]. Im Gegensatz zu ScCdc14 ist Flp1/Clp1 nicht essentiell für einen Austritt aus der Mitose. Als Teil des *separation initiation network* (SIN), eine homologe Signalkaskade zum *mitotic exit network* in *S. cerevisiae*, reguliert Flp1/Clp1 die Formation eines Septums und die Zytokinese [Cueille *et al.* 2001, Trautmann *et al.* 2001, Simanis *et al.* 2003]. Ähnlich wie in *S. cerevisiae* wirkt Flp1/Clp1 antagonistisch auf die CDK Aktivität, jedoch auf eine unterschiedliche Weise und zu einem unterschiedlichen Zweck [Trautmann & McCollum 2002]. Die CDK Aktivität wird in *S. pombe* durch die Phosphorylierung des Tyrosinrests an Position 15 in Cdc2 negativ reguliert. Diese inhibitorische Tyrosinphosphorylierung von Cdc2 wird durch die Inaktivierung der Phosphatase Cdc25 und die Aktivierung der Kinase Wee1 hervorgerufen, wobei Flp1/Clp1 zur Destabilisierung von Cdc25 beiträgt [Wolfe & Gould 2004]. Flp1/Clp1 lokalisiert ebenfalls wie ScCdc14 im Nukleolus, wird jedoch schon in der Prophase freigesetzt, wo es an den Kinetochoren, der mitotischen Spindel und dem kontraktilen Ring lokalisiert [Cueille *et al.* 2001, Trautmann *et al.* 2001, 2004]. Bei der Freisetzung von Flp1/Clp1 in der Mitose spielen Homologe des FEAR-Signalwegs keine Rolle und Flp1/Clp1 hat keine Bedeutung bei der Trennung der rDNA in *S. pombe* [Chen *et al.* 2006]. Zu Beginn der Freisetzung ist die Flp1/Clp1 Aktivität durch inhibitorische Phosphorylierung noch abgeschwächt, während in der Anaphase durch autokatalytische Dephosphorylierung eine vollständige Aktivierung der Phosphatase Flp1/Clp1 erfolgt [Wolfe *et al.* 2006]. Die Verankerung von Flp1/Clp1 im Nukleolus von *S. pombe* ist noch nicht geklärt. Es gibt zwar ein zu Net1 verwandtes nukleolares Protein, Dnt1, das Sequenzähnlichkeiten im N-terminalen Teil zu Net1 zeigt und inhibitorisch auf SIN wirkt, es scheint jedoch nicht mit Flp1/Clp1 zu interagieren und sich nicht auf dessen Aktivität auszuwirken [Jin *et al.* 2007].

Ein *CDC14* Gen in *Candida albicans* codiert für eine dual-spezifische Phosphatase, dessen Deletion Defekte in der Zellseparation, im Austritt aus der Mitose und in der Morphogenese zur Folge hat [Clemente-Blanco *et al.* 2006].

Cdc14 aus *Caenorhabditis elegans*, CeCdc14, lokalisiert an der *spindle midzone* und ist hauptsächlich an der Regulation der Zytokinese beteiligt [Gruneberg *et al.* 2002]. Zielproteine von CeCdc14 sind vor allem CDK-modifizierte Substrate.

Im Menschen gibt es zwei Cdc14 Homologe, hCdc14A und hCdc14B [Li *et al.* 1997]. *In vitro* Experimente und Analysen der Kristallstruktur von hCdc14B zeigten, dass hCdc14A und hCdc14B zu der Familie der dual-spezifischen Phosphatasen gehören, die auf Substrate von Kinasen wirken, die an S/T-P Motiven phosphoryliert sind [Kaiser *et al.* 2002, Gray *et al.* 2003]. Insbesondere dephosphoryliert hCdc14A humanes Hct1 und ist in der Lage einen

aktiven APC/hHct1 Komplex *in vitro* zu rekonstituieren [Bembenek & Yu 2001]. Weitere Substrate von hCdc14A sind Cdc25 aus *S. pombe* und humanes Cdc25A durch deren Dephosphorylierung ihre Stabilität reguliert wird [Vázquez-Novelle *et al.* 2005, Esteban *et al.* 2006]. Humanes Cdc14A lokalisiert an Interphase Zentrosomen und reguliert die Zentrosomen Replikation *in vivo* [Kaiser *et al.* 2002, Mailand *et al.* 2002]. Während der Mitose konzentriert sich hCdc14A an der *spindle midzone* und scheint an der Lokalisation des Aurora B Kinase Komplexes (Ipl1-Sli15 Komplex in *S. cerevisiae*) an dieser Struktur beteiligt zu sein [Gruneberg *et al.* 2004]. Eine Deregulation von hCdc14A führt zu Defekten in der Trennung der Zentrosomen und Chromosomen und in der Zytokinese.

Humanes Cdc14B lokalisiert in Interphase Nukleoli und wird zu Beginn der Mitose freigesetzt, im Gegensatz zu Cdc14 aus *S. cerevisiae* scheint Cdc14B keinen Einfluss auf die Assemblierung der mitotischen Spindel, den Austritt aus der Mitose, die Zytokinese und die Trennung der rDNA zu haben [Berdougo *et al.* 2008].

3.4. Das Net1-verwandte nukleolare Protein Tof2

Ursprünglich wurde das nicht essentielle Tof2 als Topoisomerase I-Interaktionsfaktor in einem Hefe-Zwei-Hybrid Assay identifiziert [Park & Sternglanz 1999]. Das nukleolare Protein Tof2 ist Teil eines großen Multi-Protein Komplexes mit Net1, Sir2 und Cdc14 [Huang *et al.* 2006]. Weiterhin wirkt Tof2 im Nukleolus als Adapter für die Bindung von Lrs4 und Csm1. Diese Proteine sind negative Regulatoren von Rekombinationsereignissen an der rDNA und inhibieren die RNA Polymerase II-abhängige Transkription dieses Gen Locus unabhängig von Sir2 [Huang *et al.* 2006].

Sequenzanalysen ergaben, dass Tof2 eine 30%-ige Sequenzidentität in seinem N-terminalen Teil mit dem N-terminalen Teil von Net1 aufweist, der für die Cdc14 Bindung und Verankerung notwendig ist [Traverso *et al.* 2001] (Abbildung 3.6). Ein Zusammenhang zwischen Tof2 und der Regulation des Zellteilungszyklus eventuell über eine Interaktion mit Cdc14 konnte noch nicht festgestellt werden. Ein Ziel dieser Arbeit war daher, die molekulare Funktion des in *S. cerevisiae* vorkommenden Net1-verwandten Proteins Tof2 genauer zu untersuchen.

Tof2	1	MIKMWRLQIVLVPPSAQDIITFLEARLNTQPQSVSPMVQYNEDIITHNNSI	
Net1	1	MYKLQVVLVPPS-----LQATMPIQFGYGPTIAESSQLLPNRTNM	
Tof2	51	NNCSDPSPTSPSSQNSIQ-SNRSSDFINYLPN-----CKKFLHFTDGDN	
Net1	41	-----AQSAGDASLOYANLRSANVSFTPSYFNQSRFRKFLLFTKPTN	
Tof2	94	TLLQLSNEILTTFDRLYPNFKESIEIVSLQDRHGCDLDSEFI IKDVFEND	
Net1	83	TLLNLSDEIIDKCEKMYPQLQEDIEILSLQDNSGCDLDPDFLVKDVFNVN	
Tof2	144	GVVLVILKDELDWSRNQHISLLQLARQRRQDNKPSTKSIVTEKRKKISK	
Net1	133	NIVRVILKNEIDLDDSAVSLYKSV--KRSKLNNGSPQSVQPQQQIPSSS	
Tof2	194	EDLSSISNKDTMHLIAKSSLKNNFINKSRVSTPLMNEILP-----
Net1	181	GVLRIAKKRPPTGTTTTTTTIRSATNGSMRVSTPLARQIYPPPPSSKIVSNN

Abbildung 3.6: Sequenzvergleich der N-terminalen Bereiche von Tof2 und Net1

Die N-terminale Proteinsequenz von Tof2 (Aminosäure 1-233) aus *S. cerevisiae* ist in der oberen Reihe dargestellt, während die Net1-Proteinsequenz aus *S. cerevisiae* (Aminosäure 1-220) in der unteren Reihe aufgeführt ist. Identische Aminosäuren sind grau unterlegt.

4. ERGEBNISSE

Aufgrund der Sequenzähnlichkeiten im N-Terminus von Tof2 zu dem für die Cdc14 Verankerung und Inhibition verantwortlichen N-terminalen Bereich von Net1 [Traverso *et al.* 2001, Huang *et al.* 2006], war ein besonderer Schwerpunkt dieser Arbeit, ein mögliches Zusammenspiel von Tof2 und Cdc14 zu analysieren. Es konnte gezeigt werden, dass der N-terminale Teil von Tof2 notwendig und hinreichend ist für eine Interaktion mit Cdc14 *in vivo*. Zusätzlich wurde durch eine *in vitro* Bindungsstudie bestätigt, dass es sich bei der Tof2-Cdc14 Interaktion um eine direkte Assoziation handelt. Außerdem inhibiert Tof2 im Unterschied zu Net1 die Phosphatase nicht, sondern unterstützt deren Aktivität *in vitro* und biologische Funktion *in vivo*.

4.1 Tof2 Lokalisation während des Zellteilungszyklus

Um die Lokalisation von Tof2 während des Zellteilungszyklus zu untersuchen, wurden über PCR-vermittelte Epitopmarkierung Stämme generiert, die C-oder N-terminal myc-Epitop markiertes *TOF2* exprimierten [Longtine *et al.* 1998, Gauss *et al.* 2005]. Durch homologe Rekombination wurden die Epitopfusionen in die chromosomale Genkopie integriert, um physiologische Expressionslevel von *TOF2* zu gewährleisten, wobei für die N-terminale Epitopmarkierung ein mehrschrittiges Protokoll durchgeführt werden musste [Gauss *et al.* 2005] (Kapitel 7.4.13). Als nukleolare Marker dienten Cdc14 und Net1, die jeweils mit einem N-terminalen myc9-Epitop versehen waren. Die epitopmarkierten Proteine wurden in einer indirekten Immunfluoreszenz mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen.

Die Analyse im Fluoreszenzmikroskop machte deutlich, dass Tof2 ähnlich zum Lokalisationsmuster von Cdc14 und Net1 ein halbmondförmiges Signal zeigt, was auf eine nukleolare Lokalisation hindeutet (Abbildung 4.1 A). Damit konnten bereits erhobene Daten zur Lokalisation von Tof2 im Nukleolus bestätigt werden [Huang *et al.* 2006]. Weiterhin ist zu erkennen, dass Tof2 ebenfalls in Zellen mit einer großen Knospe und getrennten Kernen (Anaphase Zellen) im Nukleolus lokalisiert, was auch für Net1 beobachtet werden konnte. Tof2 verändert während des Zellteilungszyklus sein nukleolare Lokalisation nicht, im Unterschied zu Cdc14, das innerhalb der Anaphase im Zellkern und Zytoplasma lokalisiert [Shou *et al.* 1999] (Abbildung 4.1 A).

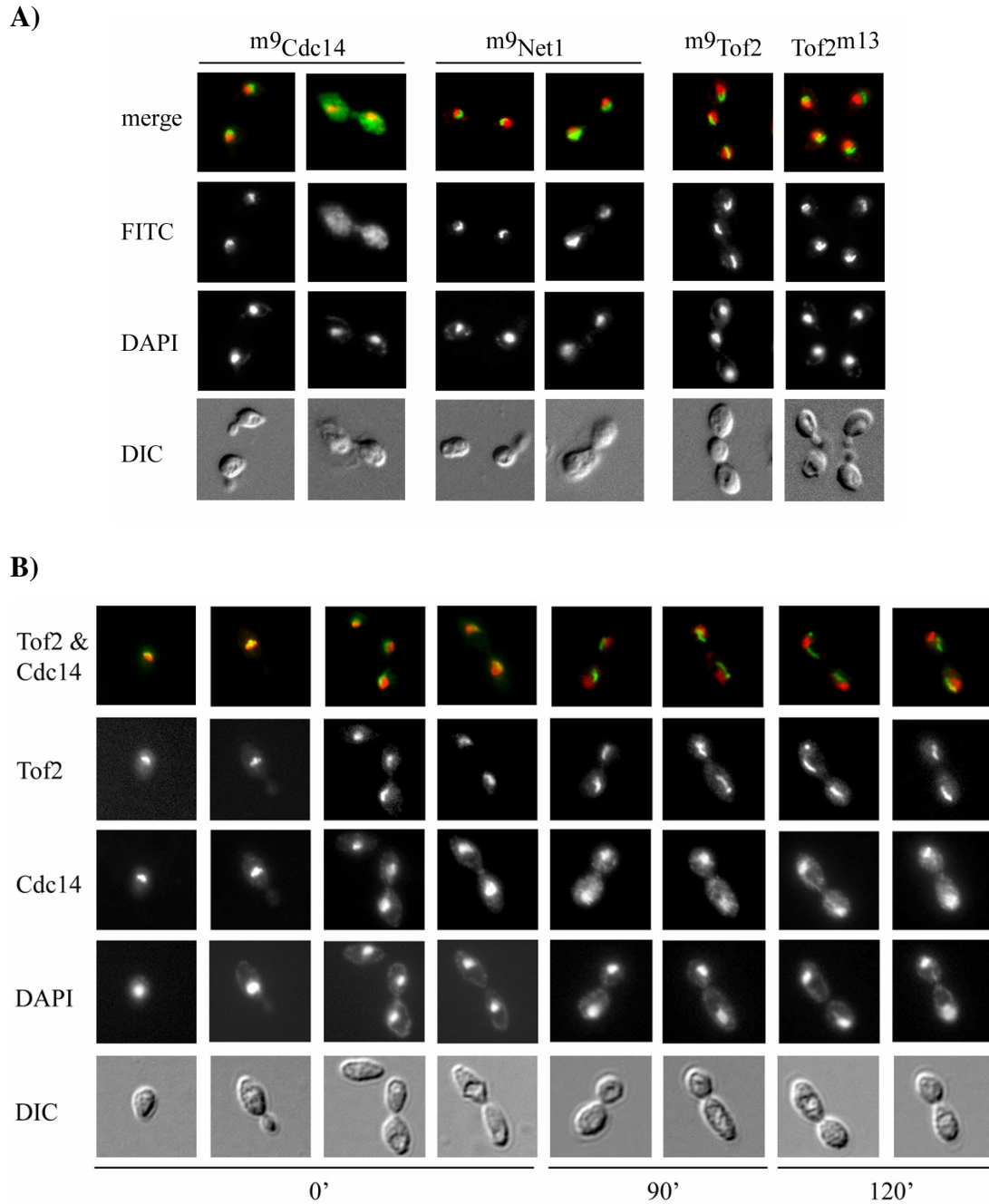


Abbildung 4.1: Lokalisation von Tof2 mittels indirekte Immunfluoreszenz

A) Lokalisation der Proteine Cdc14, Net1 und Tof2. Die Stämme W6175 (m^9CDC14), W6181 (m^9NET1), W6177 (m^9TOF2) und W4543 ($TOF2^{m13}-HIS3MX6 CDC14^{h10}-LEU2$) wurden in XY-D bei 25°C bis zur exponentiellen Wachstumsphase kultiviert. Asynchron wachsende Zellen wurden mit 4,5% Formaldehyd fixiert. Die myc-Epitop markierten Proteine (Cdc14, Net1 und Tof2) wurden mittels des Maus-anti-myc Antikörpers 9E10 und des sekundären anti-Maus Alexa488 sichtbar gemacht (FITC). Die DNA wurde durch DAPI angefärbt. Außerdem ist in der Abbildung die Zellmorphologie (DIC) und Überlagerungen der DNA Signale mit den Signalen von Cdc14, Net1 oder Tof2 (merge) zu sehen. Die Analyse der Lokalisation von m^9Cdc14 , m^9Net1 , m^9Tof2 und $Tof2^{m13}$ erfolgte im Fluoreszenzmikroskop Axio Imager von Zeiss. **B) Colokalisation von Cdc14 und Tof2 nach der Überexpression von $CLB2-ADB$.** Der Stamm W7036 ($ura3::pGAL1-CLB2-ADB-URA3 TOF2^{m13}-HIS3MX6/TOF2 CDC14^{h10}-LEU2/CDC14$) wurde in XY-R bei 25°C bis zur exponentiellen Wachstumsphase kultiviert und anschließend mit Galktose (2%) induziert. Proben wurden nach 0 min, 90 min

und 120 min genommen und mit 4,5 % Formaldehyd fixiert. Das ha-Epitop markierte Protein (Cdc14) wurde mittels des Maus-anti-ha Antikörpers 12CA5 und des sekundären anti-Maus Alexa488 sichtbar gemacht, während das myc-Epitop markierte Protein (Tof2) über einen Kaninchen-anti-myc Antikörper (A14) und den sekundären anti-Kaninchen Alexa546 detektiert wurde. Die DNA wurde mittels DAPI visualisiert. Außerdem ist die Zellmorphologie (DIC) abgebildet und eine Überlagerung der Tof2 und Cdc14 Signale. Die Analyse der Zellen erfolgte wie bereits unter A) beschrieben.

Colokalisationen von Tof2^{m13} und Cdc14^{h10} manifestierten das Ergebnis, dass Tof2 anders als Cdc14 während des gesamten Zellteilungszyklus im Nukleolus lokalisiert, noch zusätzlich (Abbildung 4.1 B, 0 Minuten). Diese Beobachtung konnte selbst unter Überexpressionsbedingungen einer stabilisierten Form des mitotischen Cyclins Clb2, dessen D-Box (*destruction box*) deletiert ist, gemacht werden. Die D-Box ist ein konserviertes Sequenzmotiv, das notwendig ist für eine APC-vermittelte Ubiquitinierung eines Proteins und die anschließende Degradation am 26S Proteasom. Der Abbau von Clb2 in der Anaphase ist essentiell für einen erfolgreichen Austritt der Zellen aus der Mitose. Die Akkumulation des stabilisierten Clb2 am Ende der Mitose führt aufgrund der hohen CDK Aktivität zu einem Anaphase Arrest. Cdc14 ist in Folge dessen freigesetzt und im Zellkern zu detektieren, während Tof2 weiterhin im Nukleolus lokalisiert (Abbildung 4.1 B, 90 & 120 Minuten).

Die Tatsache, dass das Net1-verwandte Protein Tof2 ein ähnliches nukleolares Lokalisationsmuster zeigt wie der Cdc14 Inhibitor und im Verlauf des gesamten Zellteilungszyklus im Nukleolus verbleibt, während Cdc14 freigesetzt wird, wirft die Frage auf, ob Tof2 nicht vielleicht einen weiteren Verankerungs- und Regulationsmechanismus für Cdc14 darstellen könnte.

4.2 Interaktion von Tof2 mit Cdc14 *in vivo* und *in vitro*

4.2.1 Tof2 interagiert mit Cdc14 *in vivo*

Um ein mögliches Zusammenspiel von Tof2 und Cdc14 festzustellen, wurde in Anlehnung an frühere Untersuchungen [Geil 2004] die Interaktion von Tof2, Net1 oder Nop1 mit Cdc14 *in vivo* mittels Coimmunpräzipitationen analysiert. Dazu wurden Stämme verwendet, die sowohl myc-epitopmarkiertes *NET1*, *TOF2* oder *NOP1* exprimierten als auch ha-epitopmarkiertes *CDC14*. Als Negativkontrolle diente ein Stamm, der ausschließlich ein epitopmarkiertes Allel von *CDC14* enthielt, um eine unspezifische Assoziation von Cdc14 an die Bindungsmatrix ausschließen zu können. Nop1 ist ein abundantes nukleolares Protein [Schimmang *et al.* 1989] und wurde als eine weitere Kontrolle herangezogen, mit deren Hilfe eine unspezifische

Interaktion der nukleolaren Proteine ausgeschlossen werden sollte. Die myc-Epitop markierten Proteine wurden aus Zellextrakten der Hefe präzipitiert. In einer anschließenden Western-Blot-Analyse wurde auf die Anwesenheit des ha-epitopmarkierten Cdc14 getestet (Abbildung 4.2). Cdc14^{h10} konnte sowohl im Präzipitat von Net1^{m9} als auch in dem von Tof2^{m13} detektiert werden. Im Unterschied dazu konnte nach der Präzipitation von Nop1^{m13} kein vergleichbares Cdc14 Signal erhalten werden, trotz der extrem hohen Mengen des präzipitierten Nop1. Die Negativkontrolle zeigte kein Cdc14 Signal.

Diese Daten machen deutlich, dass Tof2 und Cdc14 *in vivo* eine spezifische Interaktion aufweisen, übereinstimmend mit jüngsten Daten [Huang *et al.* 2006], die eine Komplexbildung dieser Proteine mittels Affinitätsreinigung kombiniert mit Massenspektrometrie zeigen konnten.

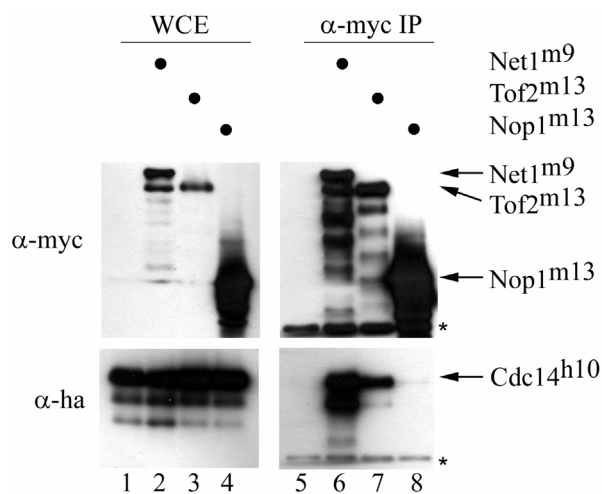


Abbildung 4.2: *In vivo* Assoziation von Tof2 bzw. Net1 mit Cdc14

Die Stämme W1137 (*CDC14^{h10}-LEU2*), W2103 (*CDC14^{h10}-LEU2 NET1^{m9}-TRP1*), W4543 (*CDC14^{h10}-LEU2 TOF2^{m13}-HIS3MX6*) und W4639 (*CDC14^{h10}-LEU2 NOP1^{m13}-HIS3MX6*) wurden bei 25°C in XY-D Medium kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Aus den Gesamtzellextrakten (WCE) wurden mit 9E10 (α -myc Antikörper) die Proteine, die mit dem myc-Epitop versehen sind, präzipitiert (Reihe 5-8, Blot oben). In der Western-Blot-Analyse der Gesamtzellextrakte und Präzipitate wurden myc-Epitop markierte Proteine mit 9E10 (α -myc Antikörper) und ha-Epitop markierte Proteine mit 12CA5 (α -ha Antikörper) nachgewiesen. Das Sternchen (*) markiert die schwere Kette des 9E10 Antikörpers.

4.2.2 Der N-terminale Teil von Tof2 ist notwendig und hinreichend für die Interaktion mit Cdc14 *in vivo*

Aufgrund der spezifischen Interaktion von Tof2 und Cdc14 *in vivo* und des vergleichbaren Lokalisationsmusters von Tof2 und Net1 während des Zellzyklus, sollte weiterhin untersucht werden, ob ähnlich zu der Net1-Cdc14 Assoziation der N-terminale Teil von Tof2 notwendig und hinreichend ist für die Interaktion mit Cdc14 *in vivo*. Dazu wurde über PCR-vermittelte

Epitopmarkierung [Longtine *et al.* 1998, Gauss *et al.* 2005] eine Serie von Tof2 Derivaten hergestellt, die entweder am C- oder N-Terminus verkürzt waren. Die C-terminalen Verkürzungen von Tof2 wurden analog zu Verkürzungen von Net1 generiert, die in Traverso *et al.* 2001 beschrieben wurden. Die auf diese Weise hergestellten Tof2 Derivate (Tof2^{m13} 1-600, Tof2^{m13} 1-341, Tof2^{m13} 1-233, ^{m9}Tof2 234-771, ^{m9}Tof2 342-771) hatten keinen Einfluss auf die Lebens- und Wachstumsfähigkeit der Zellen (Daten nicht gezeigt).

Die Analyse der Interaktionen der Verkürzungen von Tof2 mit Cdc14 erfolgte mittels Coimmunpräzipitation wie bereits in Kapitel 4.2.1 beschrieben. Dazu wurde in die Stämme mit den verschiedenen myc-Epitop markierten Tof2 Derivaten endogen markiertes Cdc14^{h10} eingeführt. Die Derivate von Tof2 wurden präzipitiert und eine mögliche Interaktion mit Cdc14 über einen Antikörper gegen das ha-Epitop nachgewiesen (Abbildung 4.3).

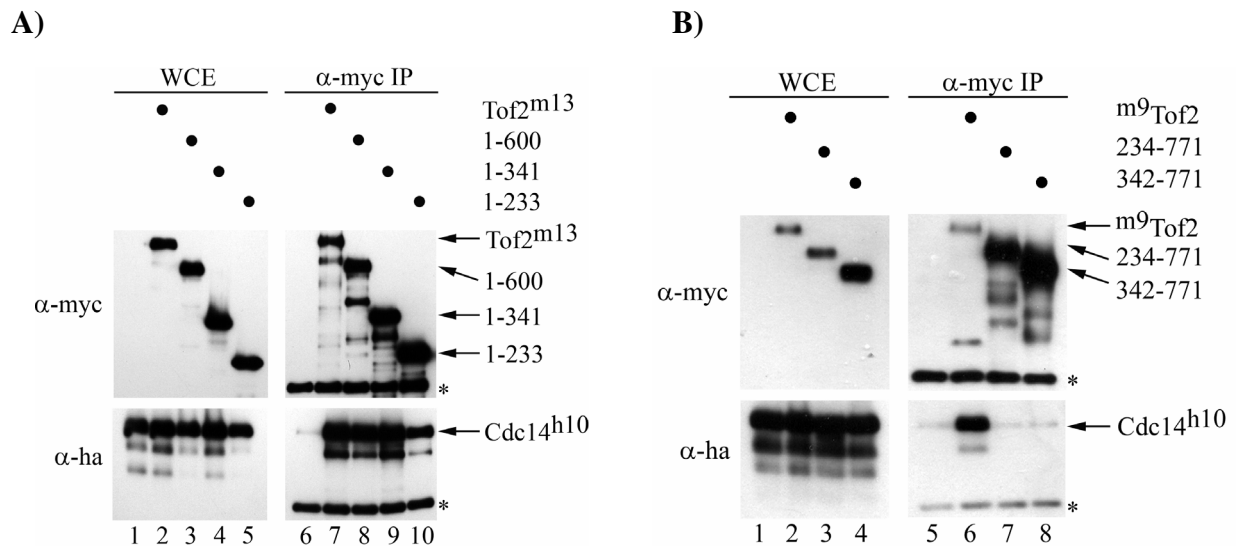


Abbildung 4.3: Untersuchung der *in vivo* Assoziation von C- oder N-terminal verkürzten Tof2 Derivaten mit Cdc14

Aus den Gesamtzelextrakten (WCE) wurden mit 9E10 (α -myc Antikörper) die Proteine, die mit dem myc-Epitop versehen sind, präzipitiert. In der Western-Blot-Analyse der Gesamtzelextrakte und Präzipitate wurden myc-Epitop markierte Proteine mit 9E10 (α -myc Antikörper) und ha-Epitop markierte Proteine mit 12CA5 (α -ha Antikörper) nachgewiesen. Das Sternchen (*) markiert die schwere Kette des 9E10 Antikörpers. **A) *In vivo* Assoziation der C-terminal verkürzten Tof2 Derivate mit Cdc14.** Die Stämme W1137 ($CDC14^{h10}$ -LEU2), W4543 ($CDC14^{h10}$ -LEU2 Tof2^{m13}-HIS3MX6), W5624 ($CDC14^{h10}$ -LEU2 Tof2^{m13} 1-600-HIS3MX6), W5625 ($CDC14^{h10}$ -LEU2 Tof2^{m13} 1-341-HIS3MX6) und W5626 ($CDC14^{h10}$ -LEU2 Tof2^{m13} 1-233-HIS3MX6) wurden bei 25°C in XY-D Medium kultiviert, in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und für eine Coimmunpräzipitation aufgearbeitet. **B) Analyse der *in vivo* Assoziation der N-terminal verkürzten Tof2 Derivate mit Cdc14.** Die Stämme W1137 ($CDC14^{h10}$ -LEU2), W6437 ($CDC14^{h10}$ -LEU2 ^{m9}Tof2), W6440 ($CDC14^{h10}$ -LEU2 ^{m9}Tof2 342-771) und W6441 ($CDC14^{h10}$ -LEU2 ^{m9}Tof2 234-771) wurden in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und für eine Coimmunpräzipitation aufgearbeitet.

Die durchgeführten Coimmunpräzipitationen machten deutlich, dass die C-terminalen Verkürzungen von Tof2 mit Cdc14 interagieren vergleichbar mit dem unverkürzten Protein, ausgenommen Tof2^{m13} 1-233, das etwas schlechter mit Cdc14 zu interagieren scheint (Abbildung 4.3 A). Dies weist darauf hin, dass der N-terminale Teil von Tof2 hinreichend ist für die Interaktion von Tof2 mit Cdc14. Demgegenüber waren in den Coimmunpräzipitationen der N-terminalen Verkürzungen von Tof2 keine Interaktionen mit Cdc14 zu detektieren (Abbildung 4.3 B). Der N-terminale Teil von Tof2 ist also nicht nur hinreichend sondern auch notwendig für eine Interaktion mit der Phosphatase.

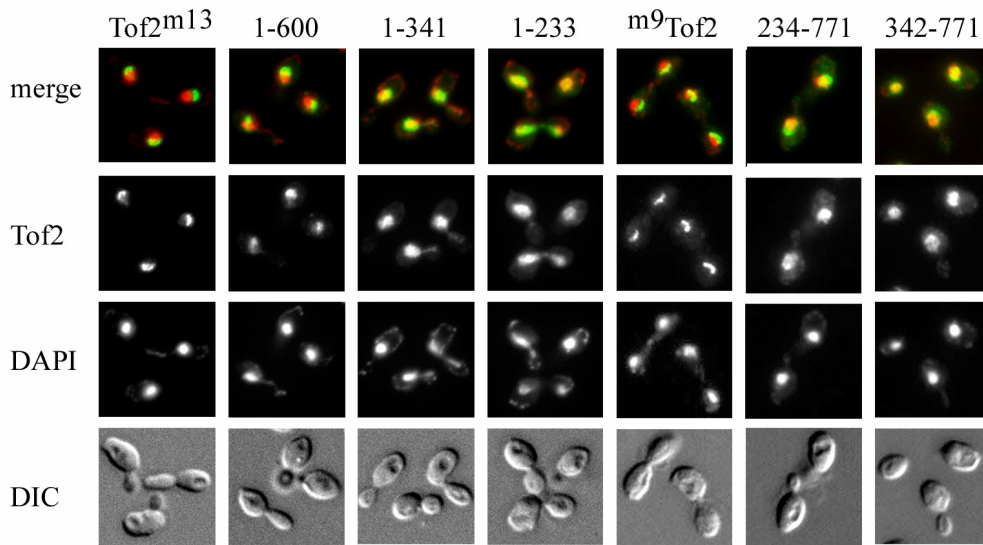
4.2.3 N- und C-terminale Bereiche tragen zur Lokalisation von Tof2 bei

Neben der Interaktion der N- und C-terminalen Verkürzungen von Tof2 mit Cdc14 sollte auch deren Lokalisation mittels indirekter Immunfluoreszenz überprüft werden. Wie schon in Kapitel 4.1 gezeigt werden konnte, lokalisiert das unverkürzte Tof2 während des gesamten Zellzyklus im Nukleolus. ^{m9}Tof2 und Tof2^{m13} zeigen in der indirekten Immunfluoreszenz ein halbmondförmiges Lokalisationsmuster neben dem Zellkern (Abbildung 4.1 A, Abbildung 4.4 A). Dies ist auch für Tof2^{m13} 1-600 zu sehen, während Tof2^{m13} 1-341, Tof2^{m13} 1-233 und die N-terminalen Verkürzungen partiell delokalisiert sind (Abbildung 4.4 A). Sie weisen neben ihrer nukleolaren Lokalisation eine Lokalisation im Zellkern auf.

Die Lokalisation von Tof2 im Nukleolus scheint also durch mehrere Bereiche des Proteins bedingt zu sein. Dieses Ergebnis wirft die Frage auf, ob die N-terminalen Verkürzungen von Tof2 in der Coimmunpräzipitation nicht mit Cdc14 interagieren, weil diese nicht mehr vollständig im Nukleolus lokalisiert sind, oder ob die Delokalisation durch die aufgehobene Interaktion mit der Phosphatase zustande kommt.

Cdc14 ist in diesen Stämmen im Nukleolus lokalisiert (Abbildung 4.4 B) außer in dem, der die Tof2^{m13} 1-233 Verkürzung exprimiert. Dieser Stamm wächst etwas langsamer, wenn er ein epitopmarkiertes Allel von *CDC14* enthält und zeigt eine Kernlokalisation der Phosphatase.

A)



B)

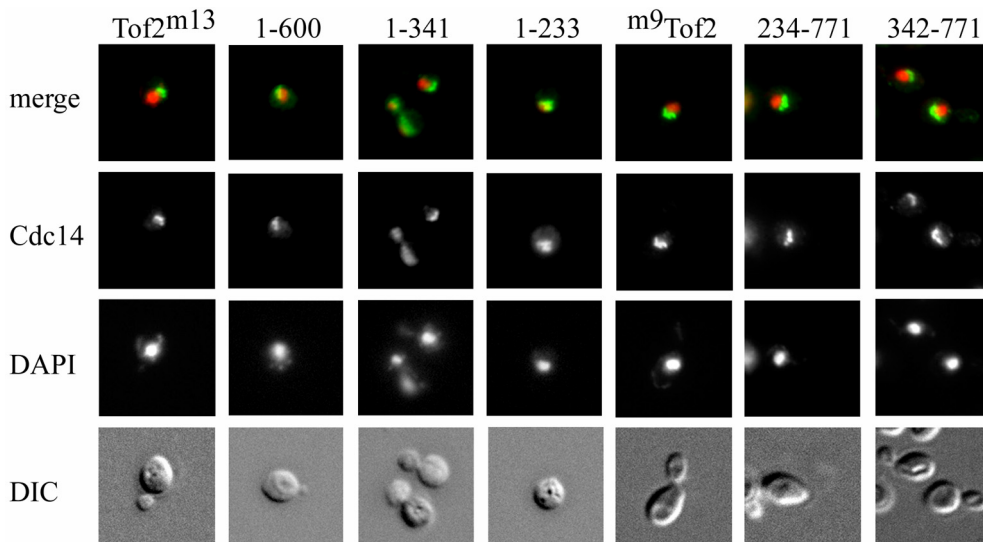


Abbildung 4.4: Lokalisation der ToF2 Derivate und von Cdc14

A) Lokalisation der C- oder N-terminal verkürzten ToF2 Derivate. Die Stämme W4543 (*CDC14^{h10}-LEU2 TOF2^{m13}-HIS3MX6*), W5624 (*CDC14^{h10}-LEU2 TOF2^{m13} 1-600-HIS3MX6*), W5625 (*CDC14^{h10}-LEU2 TOF2^{m13} 1-341-HIS3MX6*), W5626 (*CDC14^{h10}-LEU2 TOF2^{m13} 1-233-HIS3MX6*), W6177 (*m⁹TOF2*), W6179 (*m⁹TOF2 234-771*) und W6180 (*m⁹TOF2 342-771*) wurden bei 25°C in XY-D Medium kultiviert, in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und für eine indirekte Immunfluoreszenz mit 4,5% Formaldehyd 1 h fixiert. Die Analyse der Lokalisation der myc-Epitop markierten Proteine erfolgte mit 9E10 (ToF2). Anti-Maus Alexa488 diente als sekundärer Antikörper. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt. Weiterhin abgebildet ist die Zellmorphologie (DIC) und eine Überlagerung der DNA und ToF2 Signale (merge). Die Analyse der Zellen erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop Axio Imager von Zeiss. **B) Lokalisation von Cdc14.** Die Stämme W4543 (*CDC14^{h10}-LEU2 TOF2^{m13}-HIS3MX6*), W5624 (*CDC14^{h10}-LEU2 TOF2^{m13} 1-600-HIS3MX6*), W5625 (*CDC14^{h10}-LEU2 TOF2^{m13} 1-341-HIS3MX6*), W5626 (*CDC14^{h10}-LEU2 TOF2^{m13} 1-233-HIS3MX6*), W6437 (*CDC14^{h10}-LEU2 m⁹TOF2*), W6440 (*CDC14^{h10}-LEU2 m⁹TOF2 342-771*) und W6441 (*CDC14^{h10}-LEU2 m⁹TOF2*)

234-771) wurden, wie bereits unter A) beschrieben, für eine indirekte Immunfluoreszenz aufgearbeitet und im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Analyse der Lokalisation des ha-Epitop markierten Proteins erfolgte mit 12CA5 (Cdc14). Anti-Maus Alexa488 diente als sekundärer Antikörper. Zu sehen ist das Cdc14 Signal, die DNA angefärbt mit DAPI, die Zellmorphologie (DIC) und eine Überlagerung der DNA und Cdc14 Signale (merge).

4.2.4 Unterschiedliche Bindungsspezifität von Tof2 und Net1 für Cdc14 *in vivo*

Cdc14 aus diversen Spezies zeigt eine konservierte Sequenz von circa 350 Aminosäuren, die am N-Terminus lokalisiert ist und innerhalb derer das katalytische Zentrum liegt [Gray *et al.* 2003]. Die Net1 Bindungsstelle liegt innerhalb dieser konservierten Sequenz am N-Terminus von Cdc14, während die Asn/Ser reiche C-terminale Domäne, die speziesübergreifend stark divergiert, nur einen geringen Einfluss auf die Affinität von Net1 zu Cdc14 hat [Traverso *et al.* 2001].

Um festzustellen, ob Net1 und Tof2 ähnliche Bereiche von Cdc14 binden, wurden heterozygot diploide Stämme hergestellt, die C-terminale Verkürzungen von *CDC14* enthielten mit jeweils einem C-terminalen ha-Epitop (*CDC14^{h3} 1-374*, *CDC14^{h3} 1-356*). Gleichzeitig exprimierten diese Stämme *NET1* bzw. *TOF2* mit einem C-terminalen myc-Epitop. Die Coimmunpräzipitationen wurden mit den heterozygot diploiden Stämmen durchgeführt, da die C-terminalen Verkürzungen von *CDC14* in haploiden Zellen zur Letalität führten (Daten nicht gezeigt). Es erfolgten Präzipitationen mit Antikörpern gegen das myc-Epitop (9E10) und der Nachweis einer möglichen Interaktion mit einem Antikörper gegen das ha-Epitop (12CA5, Abbildung 4.5). Cdc14^{h3} 1-374 interagiert sowohl mit Net1^{m9} als auch mit Tof2^{m13}. Die Interaktion von Cdc14^{h3} 1-356 mit Net1^{m9} ist etwas schwächer (Abbildung 4.5 A), mit Tof2^{m13} scheint dieses verkürzte Derivat von Cdc14 keine Interaktion aufzuweisen (Abbildung 4.5 B). Im Western-Blot ist nicht mehr als der Hintergrund zu detektieren. Die unterschiedliche Expression der Proteine Net1 und Tof2 und die daraus folgende geringere Präzipitation von Tof2 und Copräzipitation von Cdc14 macht die Interpretation dieses Ergebnisses schwierig. Jedoch hatten Immunpräzipitationen gegen das ha-Epitop und der anschließende Nachweis einer Interaktion mit einem Antikörper gegen das myc-Epitop vergleichbare Ergebnisse zur Folge (Daten nicht gezeigt), was die Schlussfolgerung zulässt, dass die Bindungsspezifität der beiden Proteine Tof2 und Net1 für Cdc14 ein wenig unterschiedlich sein könnte.

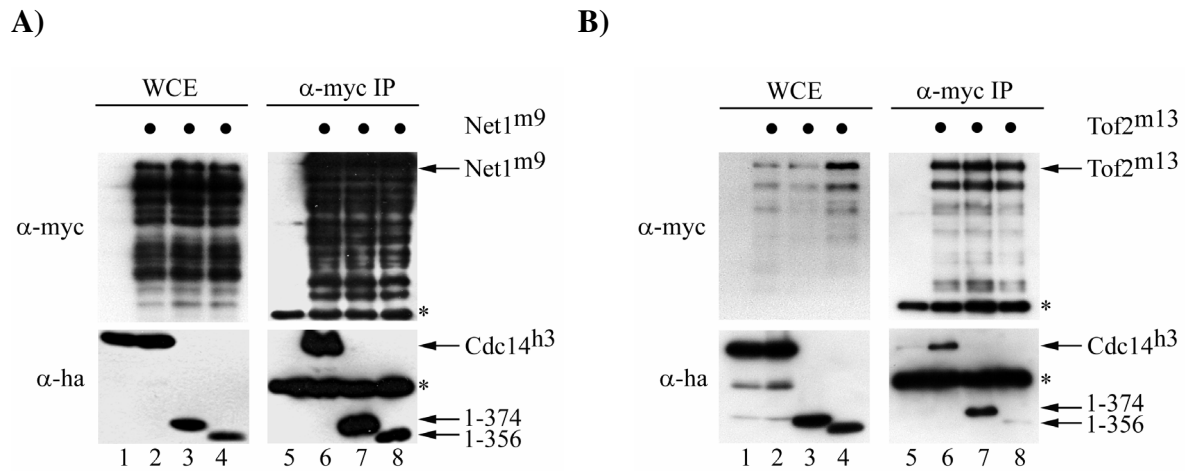


Abbildung 4.5: Analyse der *in vivo* Assoziation von Tof2 oder Net1 mit C-terminal verkürzten Derivaten von Cdc14

Aus den Gesamtzellextrakten (WCE) wurden mit 9E10 (α -myc Antikörper) myc-Epitop markierte Proteine präzipitiert. In der Western-Blot-Analyse der Gesamtzellextrakte und Präzipitate wurden myc-Epitop markierte Proteine mit 9E10 (α -myc Antikörper) und ha-Epitop markierte Proteine mit 12CA5 (α -ha Antikörper) nachgewiesen. Das Sternchen (*) markiert die schwere Kette des 9E10 Antikörpers. **A) *In vivo* Interaktion von Net1 mit verkürzten Derivaten von Cdc14.** Die Stämme W5385 (*CDC14/CDC14^{h3}-KANMX6*), W5410 (*NET1/NET1^{m9}-TRP1 CDC14/CDC14^{h3}-KANMX6*), W5411 (*NET1/NET1^{m9}-TRP1 CDC14/CDC14 1-374^{h3}-KANMX6*) und W5412 (*NET1/NET1^{m9}-TRP1 CDC14/CDC14 1-356^{h3}-KANMX6*) wurden in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und für eine Coimmunpräzipitation aufgearbeitet. **B) *In vivo* Interaktion von Tof2 mit verkürzten Derivaten von Cdc14.** Die Stämme W5385 (*CDC14/CDC14^{h3}-KANMX6*), W5099 (*TOF2/TOF2^{m13}-HIS3MX6*), W5598 (*TOF2/TOF2^{m13}-HIS3MX6 CDC14/CDC14^{h3}-KANMX6*), W5525 (*TOF2/TOF2^{m13}-HIS3MX6 CDC14/CDC14 1-374^{h3}-KANMX6*) und W5526 (*TOF2/TOF2^{m13}-HIS3MX6 CDC14/CDC14 1-356^{h3}-KANMX6*) wurden, wie bereits beschrieben, für eine Coimmunpräzipitation aufgearbeitet und die Interaktion der Proteine in einer Western-Blot-Analyse untersucht.

4.2.5 Tof2 interagiert mit Cdc14 sowohl in der S-Phase als auch in der Metaphase

Der N-terminale Teil von Tof2 ist in ähnlicher Weise wie der N-terminale Teil von Net1 notwendig und hinreichend für eine Interaktion mit Cdc14 *in vivo*, obwohl die Bindungsspezifitäten für die Phosphatase etwas unterschiedlich zu sein scheinen. Um die Tof2-Cdc14 Interaktion im Vergleich zur Interaktion von Net1 mit Cdc14 weiter zu untersuchen, wurde analysiert, ob sie auch in der S- und Metaphase besteht oder sich eventuell auf eine andere Zellzyklusphase wie die Anaphase beschränkt, in der zusätzliche Regulationsmechanismen der freigesetzten Phosphatase Cdc14 denkbar wären. Dazu wurde die Interaktion dieser Proteine nach einem Arrest der Zellen in der jeweiligen Phase mittels einer Coimmunpräzipitation getestet. Ein Arrest in der S-Phase wurde durch den Ribonukleotid-Reduktase-Inhibitor Hydroxyharnstoff (HU) erreicht und ein Metaphase-Arrest durch das

Spindelgift Nocodazol (NOC). Die Stämme, die verwendet wurden, exprimierten myc-Epitop markiertes *TOF2* bzw. *NET1* und ha-Epitop markiertes *CDC14*. *Tof2*^{m13} bzw. *Net1*^{m9} wurden jeweils präzipitiert und eine mögliche Interaktion mit *Cdc14*^{h10} in einer Western-Blot-Analyse über einen Antikörper gegen das ha-Epitop festgestellt (Abbildung 4.6).

Die Interaktion von *Tof2* mit *Cdc14* bleibt nach einem Arrest der Zellen in der S- und Metaphase bestehen. Die Mengen an *Cdc14*, die nach der Behandlung mit HU oder NOC mit *Tof2* bzw. *Net1* in einer Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden konnten, sind vergleichbar mit den Mengen an *Cdc14*, die in einer asynchronen Kultur mit den beiden Proteinen copräzipitiert wurden. Die *Tof2*-*Cdc14* Interaktion verhält sich also ähnlich zu der *Net1*-*Cdc14* Interaktion. Sie ist sowohl in der S- als auch in der Metaphase zu detektieren. Die Frage resultiert, wie sich die Interaktion von *Tof2* mit *Cdc14* in der Anaphase verhält, was in Kapitel 4.2.6 genauer untersucht wurde.

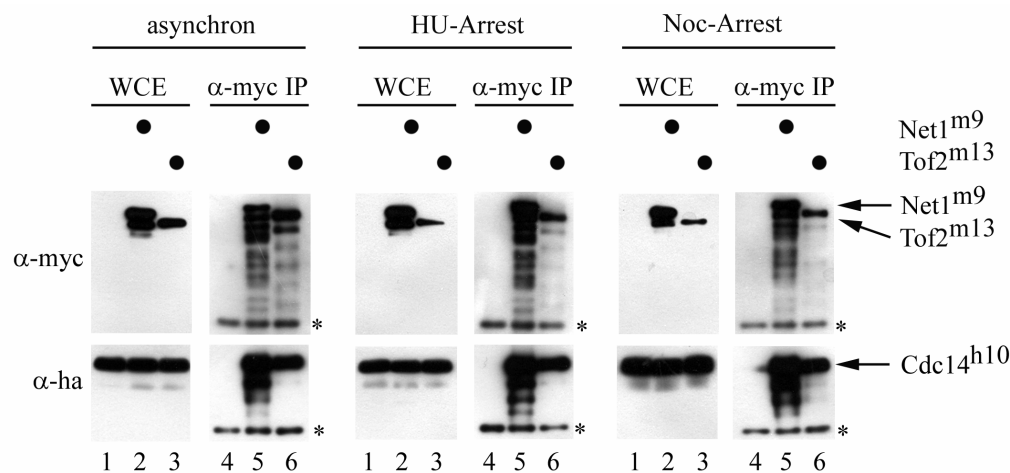


Abbildung 4.6: *In vivo* Assoziation von *Tof2* bzw. *Net1* mit *Cdc14* nach einem Arrest mit Hydroxyharnstoff oder Nocodazol

Die Stämme W1137 (*CDC14*^{h10}-*LEU2*), W2103 (*NET1*^{m9}-*TRP1 CDC14*^{h10}-*LEU2*) und W4543 (*TOF2*^{m13}-*HIS3MX6 CDC14*^{h10}-*LEU2*) wurden in XY-D Medium bei 25°C bis zur exponentiellen Wachstumsphase kultiviert (0,5 OD) und für 3h mit Hydroxyharnstoff (0,1 M) oder Nocodazol (7,5 µg/ml) behandelt. Die mit HU behandelten Zellen arretieren in der S-Phase, mit NOC behandelte Zellen in der Metaphase. Der Arrest wurde mikroskopisch überprüft. Von den arretierten Stämmen wurden Proben für eine Coimmunpräzipitation aufgearbeitet. Aus den Gesamtzellextrakten (WCE) wurden mit 9E10 (α-myc Antikörper) *Tof2* bzw. *Net1* präzipitiert. In der Western-Blot-Analyse der Gesamtzellextrakte und Präzipitate wurden myc-Epitop markierte Proteine mit 9E10 (α-myc Antikörper) und ha-Epitop markierte Proteine mit 12CA5 (α-ha Antikörper) nachgewiesen. Das Sternchen (*) markiert die schwere Kette des 9E10 Antikörpers.

4.2.6 Die Tof2 Interaktion mit Cdc14 nimmt innerhalb der Anaphase ab

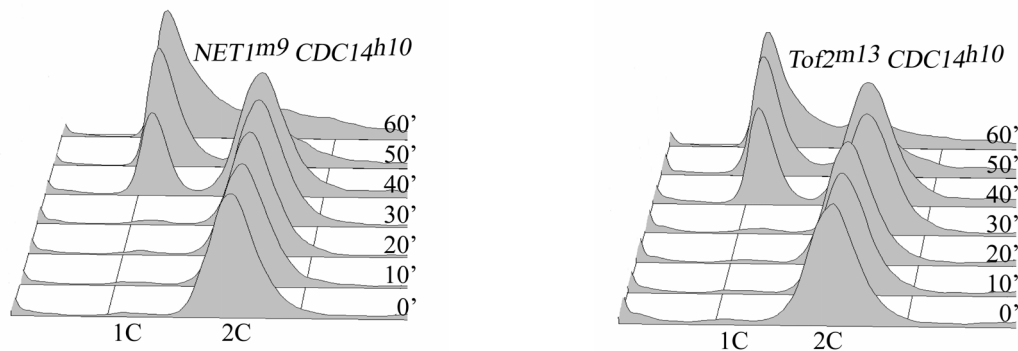
Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Tof2-Cdc14 Interaktion auch in der S- und Metaphase besteht, sollte sie außerdem im Verlauf der Anaphase untersucht werden, da in dieser Phase die Interaktion von Net1 mit Cdc14 aufgrund der Freisetzung der Phosphatase von seinem Inhibitor abnimmt. Mit Hilfe dieses Experiments sollte geklärt werden, ob Tof2 sich in ähnlicher Weise wie der Cdc14 Inhibitor Net1 verhält und eine verminderte Tof2-Cdc14 Interaktion in der Anaphase zu detektieren ist oder ob die Interaktion von Tof2 mit Cdc14 in dieser Zellzyklus-Phase bestehen bleibt. Dazu wurden Stämme, die sowohl myc-Epitop markiertes *TOF2* bzw. *NET1* exprimierten als auch ha-Epitop markiertes *CDC14* mittels einer genetischen Vorgehensweise über die Deletion von *CDC20*, ein wichtiger Regulator des Metaphase-Anaphase Übergangs, in der Metaphase arretiert [Shirayama *et al.* 1999]. Nach der Wiederherstellung von funktionellem *CDC20* war es den Zellen möglich synchron in die Anaphase hineinzulaufen (Kapitel 7.2.2.2). Zu den in der Abbildung 4.7 angegebenen Zeitpunkten wurden Proben genommen und für eine Analyse am Durchflußzytometer und für Coimmunpräzipitationen aufgearbeitet. Für die Coimmunpräzipitationen wurden die myc-Epitop markierten Proteine präzipitiert und in einem α -ha Western auf die Interaktion mit Cdc14 getestet.

Die Profile der Durchflußzytometrie dienten als Kontrolle für die Synchronizität der Zellen. Es ist zu erkennen, dass ein erfolgreicher Post-S-Phase-Arrest der Zellen stattgefunden hat (Abbildung 4.7 A). Die beiden Experimentalstämme (*NET1^{m9} CDC14^{h10} cdc20-Δ pGALL-CDC20*; *TOF2^{m13} CDC14^{h10} cdc20-Δ pGALL-CDC20*) weisen direkt nach dem Zellzyklusarrest (0 Minuten) einen 2C DNA-Gehalt auf (replizierter DNA). Die Zellen scheinen jedoch nicht vollständig synchron zu sein. 40 Minuten nach der Aufhebung des Metaphase Arrests hat ein Teil der Zellpopulation bereits Zytokinese vollzogen (1C DNA-Gehalt) bei noch vorhandenen Zellen mit replizierter DNA (2C DNA-Gehalt).

Abbildung 4.7 B zeigt die Ergebnisse der Coimmunpräzipitationen für die zu untersuchenden Interaktionen von Tof2 bzw. Net1 mit Cdc14 während der Anaphase. Vergleichbare Mengen an Tof2 und Net1 konnten präzipitiert werden. Die Menge an copräzipitiertem Cdc14 macht deutlich, dass die Interaktionen von Tof2 bzw. Net1 mit Cdc14 ein ähnliches Verhalten zeigen. 20 min nachdem die Zellen synchron von der Metaphase in die Anaphase gestartet sind, nimmt die Interaktion von Tof2 bzw. Net1 mit Cdc14 ab, weniger Cdc14 wurde mit Tof2 bzw. Net1 copräzipitiert. Anschließend nimmt die Interaktion von Tof2 bzw. Net1 mit Cdc14 wieder zu, was sich in den steigenden Mengen des copräzipitierten Cdc14 widerspiegelt. Ähnlich zur Net1-Cdc14 Interaktion scheint also auch die *in vivo* Assoziation

von Tof2 mit Cdc14 während der Anaphase schwächer zu werden, was für eine Freisetzung der Phosphatase von Tof2 in dieser Phase sprechen würde. Es ist auffällig, dass die Abnahme der Interaktionen von sowohl Tof2 als auch Net1 mit Cdc14 in der Anaphase nicht gänzlich zurück geht, sondern nur eine schwache Abnahme zu erkennen ist, was auf die Synchronizität der Zellen zurückgeführt werden könnte bzw. die Möglichkeit offen ließe, dass ein Teil der Phosphatase während der Anaphase im Nukleolus verankert bleibt. Außerdem müssen diese Daten mit dem Hintergrund betrachtet werden, dass Cdc14, Net1 und Tof2 im Nukleolus in einem großen Multi-Protein-Komplex vorliegen [Huang *et al.* 2006]. Daraus folgt, dass bei der Präzipitation von Tof2 bzw. Net1 ein Teil des jeweils anderen Proteins mitpräzipitiert wird, so dass man in den Copräzipitationen auch immer einen Teil von Cdc14 detektiert, der nicht direkt mit dem präzipitierten Protein interagiert. Daher sollten die Bindungsverhältnisse von Cdc14, Net1 und Tof2 zunächst *in vivo* genauer untersucht (Kapitel 4.2.7 und 4.2.8) und auch *in vitro* getestet werden (Kapitel 4.2.9).

A)



B)

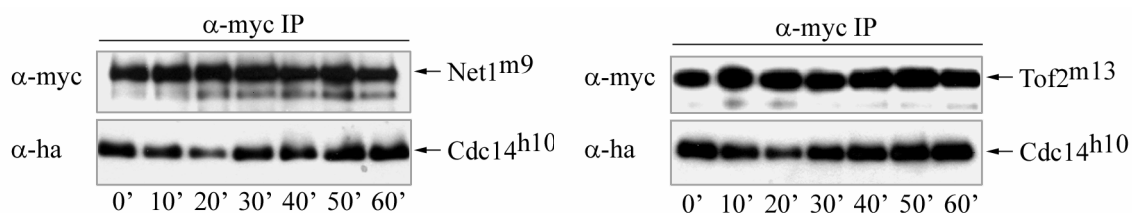


Abbildung 4.7: *In vivo* Assoziation von Tof2 bzw. Net1 mit Cdc14 während der Anaphase

Die Stämme W6172 (*NET1^{m9}-TRP1 CDC14^{h10}-LEU2 cdc20-Δ::LEU2 ade2::pGALL-CDC20-ADE2*) und W6174 (*TOF2^{m13}-HIS3MX6 CDC14^{h10}-LEU2 cdc20-Δ::LEU2 ade2::pGALL-CDC20-ADE2*) wurden in XY-Raf/Gal (je 2%) Medium bei 25°C bis zur exponentiellen Wachstumsphase kultiviert (OD 0,4), gewaschen und für 2,5 h in XY-D Medium (25°C) zur Repression des *GALL*-Promotors umgesetzt. Durch das Abschalten von *CDC20* erfolgt ein Arrest der Zellen in der Metaphase. Die arretierten Zellen wurden erneut gewaschen und für eine weitere Stunde in XY-Raf/Gal (je 2%) kultiviert. In 10 Minuten Abständen wurden Proben genommen für die Analyse am Durchflußzytometer A) und Coimmunpräzipitationen B). A) **Durchflußzytometrische**

Analysen. Die genommenen Proben wurden ethanolfixiert und für die Durchflußzytometrie aufgearbeitet. Abgebildet ist der DNA-Gehalt der Zellen (G1 = 1C; M-Phase = 2C). **B) Analyse der Interaktion von Tof2 bzw. Net1 mit Cdc14 während der Anaphase.** Aus den Gesamtzellextrakten (WCE) wurden mit 9E10 (α -myc Antikörper) die Proteine, die mit dem myc-Epitop versehen sind, präzipitiert. In der Western-Blot-Analyse der Gesamtzellextrakte und Präzipitate wurden myc-Epitop markierte Proteine mit 9E10 (α -myc Antikörper) und ha-Epitop markierte Proteine mit 12CA5 (α -ha Antikörper) nachgewiesen. In diesem Versuchsansatz wurden 45 OD Protein präzipitiert und 1-4 μ l einer 1:20 Verdünnung des Präzipitats für den Nachweis des copräzipitierten Cdc14 aufgetragen. Für den Nachweis der Mengen an präzipitiertem Tof2 bzw. Net1 wurden 3 μ l unverdünntes Präzipitat aufgetragen.

4.2.7 Tof2 interagiert mit Net1 *in vivo*

Wie bereits erwähnt, weisen jüngste Studien darauf hin, dass Tof2 in einem größeren Multi-Protein-Komplex mit Cdc14 und Net1 im Nukleolus vorliegt [Huang *et al.* 2006]. Es konnte gezeigt werden, dass Tof2 und Net1 *in vivo* interagieren. Dieses Ergebnis wurde außerdem innerhalb dieser Arbeit bestätigt (Abbildung 4.8). Heterozygot diploide Stämme, die myc-Epitop markiertes *TOF2* bzw. *NET1* und ha-Epitop markiertes *NET1* bzw. *TOF2* (*TOF2^{m13}/TOF2* *NET1^{h3}/NET1*, *NET1^{m13}/NET1* *TOF2^{h3}/TOF2*) exprimierten, wurden innerhalb einer Coimmunpräzipitation untersucht, wobei eine Präzipitation der myc-markierten Proteine stattfand. In einem α -ha Western konnte eine Interaktion der Proteine analysiert werden.

Abbildung 4.8 zeigt, dass Net1 mit Tof2 copräzipitiert werden konnte, was auch für den umgekehrten Fall gilt. Tof2 interagiert also nicht nur mit Cdc14 *in vivo* sondern auch mit Net1 und bildet somit mit diesen Proteinen einen größeren Komplex im Nukleolus.

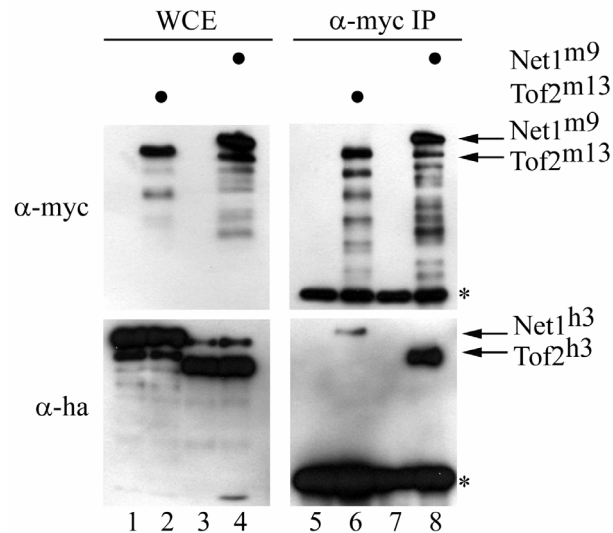


Abbildung 4.8: *In vivo* Assoziation von Tof2 und Net1

Die Stämme W6056 (*NET1^{h3}-KANMX6*), W6057 (*NET1^{h3}-KANMX6 TOF2^{m13}-HIS3MX6*), W6058 (*TOF2^{h3}-KANMX6*) und W6059 (*TOF2^{h3}-KANMX6 NET1^{m9}-TRP1*) wurden bei 25°C in XY-D Medium kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Aus den Gesamtzellextrakten (WCE) wurden mit 9E10 (α -myc Antikörper) die Proteine, die mit dem myc-Epitop versehen sind, präzipitiert. In der Western-Blot-Analyse der Gesamtzellextrakte und Präzipitate wurden myc-Epitop markierte Proteine mit 9E10 (α -myc Antikörper) und ha-Epitop markierte Proteine mit 12CA5 (α -ha Antikörper) nachgewiesen. Das Sternchen (*) markiert die schwere Kette des 9E10 Antikörpers.

4.2.8 Tof2 interagiert nicht mit Cdc14 in *net1-Δ* Mutanten

Aufgrund der *in vivo* Interaktion von Tof2 und Net1 sollte untersucht werden, ob die Tof2-Cdc14 Interaktion in Abhängigkeit von Net1 erfolgt. Dazu wurden Stämme herangezogen, in denen *NET1* deletiert ist, wovon ein Stamm zusätzliches *RRN3* exprimierte. Rrn3 ist ein Transkriptionsaktivator der RNA Polymerase I. In der Publikation von Shou *et al.* 2001 konnte gezeigt werden, dass die Expression von zusätzlichem *RRN3* das Wachstumsverhalten von *net1-Δ* Mutanten verbessert und zur Relokalisation einiger nukleolarer Proteine beiträgt, da nach der Deletion von *NET1* die nukleolare Integrität stark beeinträchtigt ist. Als Positivkontrolle wurde ein Stamm, der Wildtyp *NET1* exprimierte, verwendet. In einer anschließenden Coimmunpräzipitation wurde auf die Interaktion von myc-Epitop markiertem Tof2 und ha-Epitop markiertem Cdc14 in dem *net1*-Deletionshintergrund getestet.

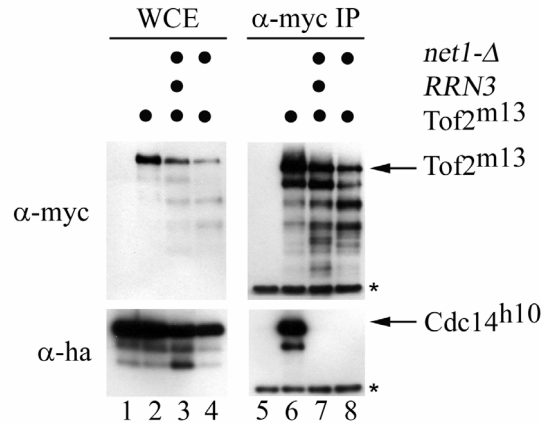


Abbildung 4.9: Analyse der *in vivo* Assoziation von Tof2 und Cdc14 in *net1-Δ* Mutanten

Die Stämme W1137 (*CDC14^{h10}-LEU2*), W4543 (*CDC14^{h10}-LEU2 TOF2^{m13}-HIS3MX6*), W5811 (*CDC14^{h10}-LEU2 TOF2^{m13}-NATMX4 net1-Δ::HIS3MX6 pTEF-RRN3-ICYC1-URA3 ARS/CEN*) und W5825 (*CDC14^{h10}-LEU2 TOF2^{m13}-NATMX4 net1-Δ::HIS3MX6*) wurden bei 25°C kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. W5811 wurde in SD-Ura kultiviert, während die restlichen Stämme in XY-D Medium kultiviert wurden. Aus den Gesamtzellextrakten (WCE) wurden mit 9E10 (α-myc Antikörper) die Proteine, die mit dem myc-Epitop versehen sind, präzipitiert. In der Western-Blot-Analyse der Gesamtzellextrakte und Präzipitate wurden myc-Epitop markierte Proteine mit 9E10 (α-myc Antikörper) und ha-Epitop markierte Proteine mit 12CA5 (α-ha Antikörper) nachgewiesen. Das Sternchen (*) markiert die schwere Kette des 9E10 Antikörpers.

Ist *NET1* deletiert, kann keine Interaktion von Tof2 mit Cdc14 detektiert werden (Abbildung 4.9), selbst in der *net1-Δ* Mutante, die zusätzliches *RRN3* exprimiert, war keine Interaktion von Tof2 mit Cdc14 festzustellen. Dieses Ergebnis ist schwer zu deuten, da die nukleolare Struktur in *net1-Δ* Mutanten komplett aufgehoben ist, was bedeutet, dass nukleolare Proteine darunter auch Tof2 und Cdc14 delokalisiert sind (Kapitel 4.3.2, Abbildung 4.13). Auch die zusätzliche Expression von *RRN3* trägt nicht zu einer Relokalisation von Tof2 und Cdc14 in den Nukleolus bei (Kapitel 4.3.2.1, Abbildung 4.14 B). Es wäre denkbar, dass die nukleolare Struktur notwendig ist, um die Interaktion von Tof2 mit Cdc14 zu etablieren.

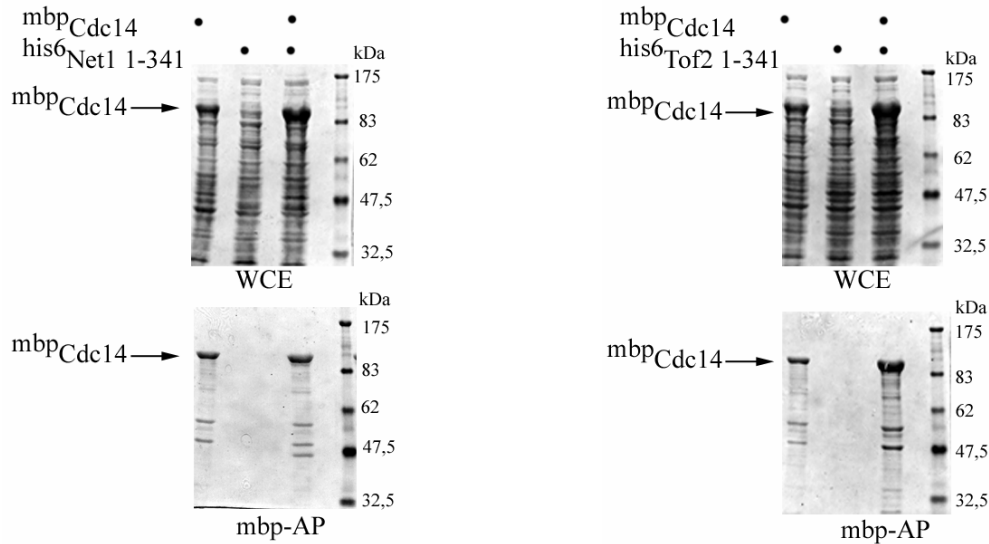
4.2.9 Tof2 interagiert mit Cdc14 *in vitro*

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Tof2 in einem größeren nukleolaren Komplex mit Cdc14 und Net1 *in vivo* vorliegt und die Interaktion von Tof2 mit Cdc14 in der *net1-Δ* Mutante aufgehoben ist, stellte sich die Frage, ob Tof2 direkt mit Cdc14 *in vitro* interagieren kann.

Dazu wurde ^{mbp}*CDC14* mit N-terminalen Bereichen von *TOF2* bzw. *NET1* (^{his6}*TOF2* 1-341 bzw. ^{his6}*NET1* 1-341) in *E. coli* coexprimiert. Über eine Amylose Bindungsmatrix konnte

^{mbp}Cdc14 präzipitiert werden und in einem α -his Western wurde auf die Interaktion mit Tof2 bzw. Net1 getestet (Kapitel 7.1.4 und 7.5.7).

A)



B)

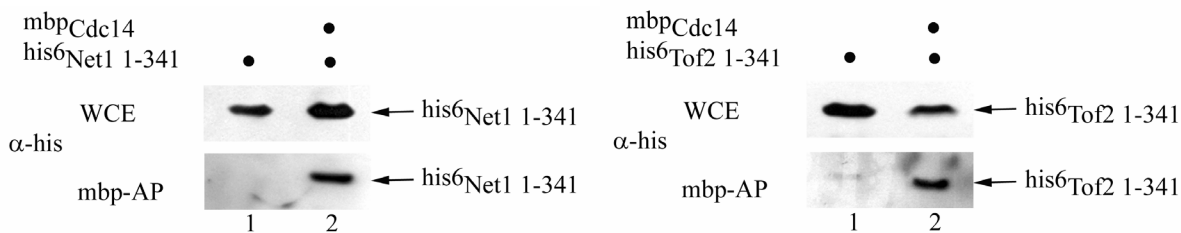


Abbildung 4.10: *In vitro* Assoziation von ^{his6}Tof2 und ^{his6}Net1 mit ^{mbp}Cdc14

^{his6}TOF2 1-341 oder ^{his6}NET1 1-341 wurden mit (pWS2018, pWS2026) oder ohne (pWS1828, pWS1824) ^{mbp}CDC14 in *E. coli* exprimiert, wobei die Expression über Rhamnose (0,2%) induziert wurde. Aus den Gesamtzellextrakten (WCE) wurde über eine Amylose Bindungsmatrix ^{mbp}Cdc14 präzipitiert. In einer Western-Blot-Analyse wurden die Gesamtzellextrakte (WCE) und die Präzipitate (mbp-AP) analysiert.

Abbildung 4.10 A zeigt die Ponceau S Färbungen der Zelllysate und Präzipitate. ^{mbp}Cdc14 konnte im Gesamtzelllysate detektiert werden (obere Reihe, WCE) und wurde erfolgreich präzipitiert (untere Reihe, mbp-AP). In Abbildung 4.10 B ist die Western-Blot-Analyse der Zelllysate und Präzipitate zu sehen. Sowohl ^{his6}TOF2 1-341 als auch ^{his6}NET1 1-341 wurden exprimiert (obere Reihe, WCE). Außerdem konnten beide Proteine im Präzipitat von ^{mbp}Cdc14 nachgewiesen werden (untere Reihe, mbp-AP), was auf eine direkte Interaktion des N-terminalen Teils von Tof2 mit Cdc14 *in vitro* schließen lässt. Es handelt sich dabei um eine spezifische Interaktion, da ^{his6}Tof2 1-341 bzw. ^{his6}Net1 1-341 nicht in Stämmen detektiert werden konnten, die kein ^{mbp}CDC14 exprimierten.

Neben den Sequenzähnlichkeiten der N-terminalen Teile von Tof2 und Net1 konnte in dieser Bindungsanalyse *in vitro* gezeigt werden, dass diese Bereiche nicht nur *in vivo* mit Cdc14 einen gemeinsamen Komplex bilden, sondern dass eine direkte Interaktion zwischen Tof2 und Cdc14 vorliegt vergleichbar zur Net1-Cdc14 Interaktion.

4.3 Tof2, ein zu Net1 alternativer nukleolarer Anker für Cdc14?

Tof2 ist ein nukleolares Protein und interagiert in ähnlicher Weise mit Cdc14 wie das große multifunktionelle Protein Net1. Net1 verankert die Phosphatase im Nukleolus und inhibiert somit deren Aktivität bis zur Freisetzung von Cdc14 in der Anaphase. Die aktive Phosphatase vermittelt in dieser Phase des Zellzyklus multiple Ereignisse, die die Zellen auf einen erfolgreichen Austritt aus der Mitose und die Zytokinese vorbereiten. Aufgrund der Sequenzähnlichkeiten in den N-terminalen Bereichen von Tof2 und Net1, könnte man annehmen, dass Tof2 ein zu Net1 alternativer Anker für Cdc14 sein könnte und Cdc14 bis zur Metaphase im Nukleolus zurückhält und inhibiert ähnlich wie Net1. Die unterschiedlichen Mengenverhältnisse von Cdc14 und Net1, basierend auf Ghaemmaghami *et al.* 2003 liegt circa fünfmal soviel Cdc14 wie Net1 in der Zelle vor, sprechen dafür, dass es einen weiteren Inhibitor bzw. Verankerungs- und Regulationsmechanismus für die Phosphatase im Nukleolus geben könnte.

Um einen Eindruck zu bekommen, in welchem Mengenverhältnis Cdc14 im Vergleich zu Tof2 und Net1 in der Zelle vorliegt, wurde eine grobe Abschätzung in einer Western-Blot-Analyse vorgenommen. Damit der Nachweis der Proteine mit demselben Antikörper durchgeführt werden konnte, um die Proteinmengen direkt miteinander vergleichen zu können, wurden Stämme hergestellt, die endogen C-terminal ha3-Epitop markiertes *CDC14*, *TOF2* und *NET1* exprimierten. Durch eine Proteinmengenbestimmung nach Bradford und eine Ponceau-Färbung der Membran wurde sichergestellt, dass äquivalente Proteinmengen auf das Gel geladen wurden. In Abbildung 4.11 ist zu erkennen, dass Cdc14 im Vergleich zu Tof2 in zehnfacher Menge vorliegt und im Vergleich zu Net1 in fünffacher Menge. Außerdem ist in der Zelle ungefähr zwei- bis dreimal weniger Tof2 als Net1 vorhanden. Ein weiterer Verankerungsmechanismus für Cdc14 wäre also durchaus vorstellbar. Taylor *et al.* 1997 konnten zwar zeigen, dass Cdc14 Dimere bzw. Trimere bildet, was jedoch das Problem des fünffachen Überschuss an Cdc14 im Vergleich zu seinem Inhibitor nicht völlig löst. Zudem ist noch nicht geklärt, ob Cdc14 tatsächlich *in vivo* oligomerisiert.

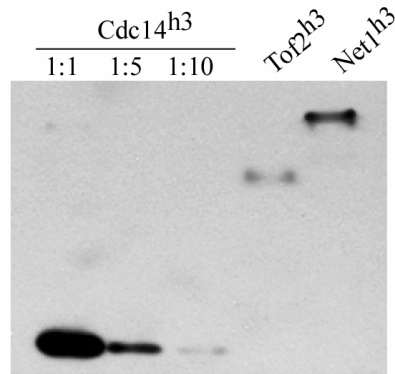


Abbildung 4.11: Mengenvergleich von Cdc14, Tof2 und Net1

Die Stämme W5385 (*CDC14^{h3}-KANMX6/CDC14*), W6058 (*TOF2^{h3}-KANMX6/TOF2*) und W6056 (*NET1^{h3}-KANMX6/NET1*) wurden bei 25°C in XY-D Medium kultiviert. Aus der exponentiellen Wachstumsphase wurden die Zellen geerntet und für die Western-Blot-Analyse aufgearbeitet. Die Lysate wurden in den angegebenen Verdünnungen aufgetragen. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit dem 12CA5 (α -ha) Antikörper.

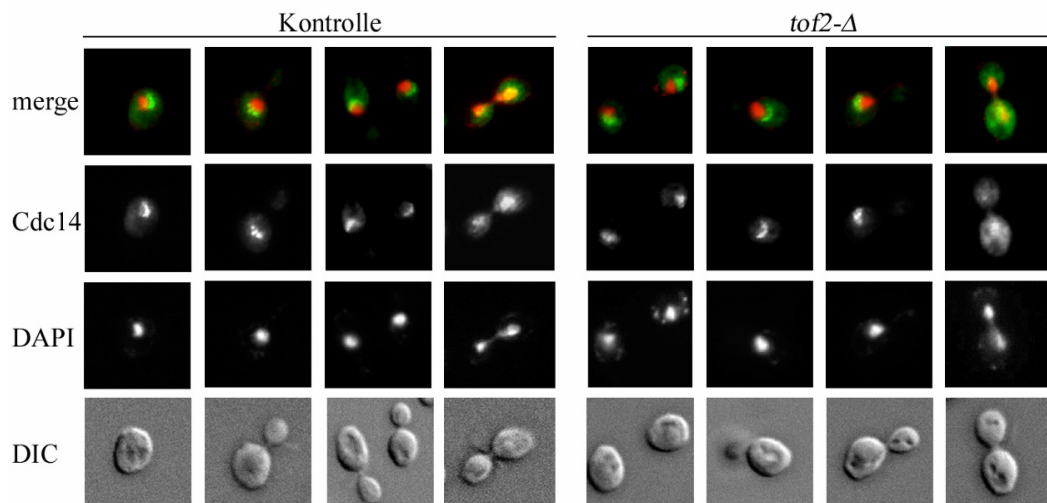
4.3.1 Cdc14 lokalisiert in *tof2-Δ* Mutanten im Nukleolus

Wäre Tof2 ein zu Net1 alternativer inhibitorischer Anker für Cdc14, wäre zu erwarten, dass in der Deletionsmutante von *TOF2* partiell delokalisiertes Cdc14 bereits vor der Anaphase zu detektieren ist. Es kann nur eine partielle Delokalisation der Phosphatase angenommen werden, da der Cdc14 Inhibitor Net1 noch vorhanden und in der Lage ist, mit Cdc14 zu interagieren.

Asynchrone Kulturen einer *tof2*-Deletionsmutante, die zusätzlich ha4-Epitop markiertes *CDC14* aufweisen, wurden in einer indirekten Immunfluoreszenz analysiert (Abbildung 4.12). Sowohl im Kontrollstamm (*tof2-Δ/TOF2 CDC14^{h4}/CDC14*) als auch in den Experimentalstämmen (*tof2-Δ/tof2-Δ CDC14^{h4}/CDC14*) lokalisiert Cdc14 im Nukleolus (Abbildung 4.12 A). Eine Freisetzung von Cdc14 in einer anderen Zellzyklusphase außer der Anaphase konnte nicht detektiert werden. Es wäre denkbar, dass die Menge an freigesetztem Cdc14 unter der Nachweisgrenze liegt, da der Großteil von Cdc14 im Nukleolus über Net1 verankert bleibt. Außerdem könnte man sich vorstellen, dass die Tof2-Cdc14 Interaktion von zeitlich begrenzter Natur sein könnte und daher in der indirekten Immunfluoreszenz asynchroner Kulturen nur schwer zu detektieren ist.

Für die Lokalisation von Cdc14 in *tof2*-Deletionsmutanten wurden heterozygot diploide Stämme für das epitopmarkierte *CDC14* gewählt, da die *TOF2* Deletion in Kombination mit veränderten *CDC14* Allelen synthetische Effekte zeigt (Kapitel 4.5.2). Zudem konnte durch den Einsatz eines Cdc14 Antiserums in *tof2*-Deletionsmutanten ohne epitopmarkiertes *CDC14* Allel die Phosphatase visualisiert werden. Auch in diesem Versuchsansatz war kein anomales Lokalisationsmuster für Cdc14 zu detektiert (Abbildung 4.12 B).

A)



B)

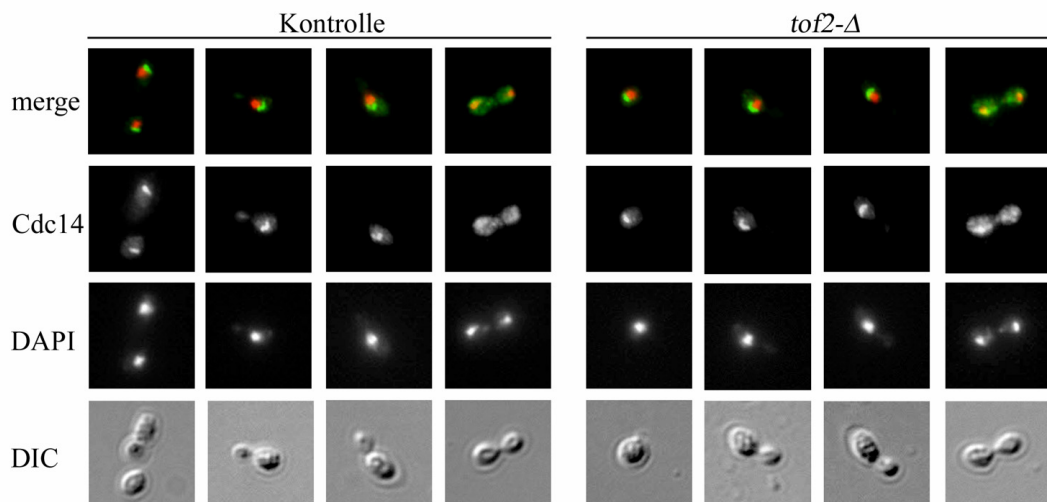


Abbildung 4.12: Lokalisation von Cdc14 in *tof2-Δ* Mutanten

A) Lokalisation von Cdc14 in *tof2*-Deletionsmutanten über eine epitopmarkiertes *CDC14* Allel. Die Stämme W5549 (*tof2-Δ::NATMX4/TOF2 CDC14^{h4}-LEU2/CDC14*), W5943 (*tof2-Δ::NATMX4/tof2-Δ::HIS3MX6 CDC14^{h4}-LEU2/CDC14*), W5550 (*tof2-Δ::NATMX4/tof2-Δ::HIS3MX6 CDC14^{h4}-LEU2 /CDC14*) wurden in XY-D bei 25°C bis zur exponentiellen Wachstumsphase kultiviert. Asynchron wachsende Zellen wurden mit Formaldehyd fixiert. Das ha-Epitop markierte Cdc14 wurde mittels des Maus-anti-ha Antikörpers 12CA5 und des sekundären anti-Maus Alexa488 sichtbar gemacht. Die DNA wurde durch DAPI angefärbt. Abgebildet ist außerdem die Zellmorphologie (DIC) und eine Überlagerung der DNA und Cdc14 Signale (merge). Die Analyse der Lokalisation von Cdc14 in *tof2-Δ* Mutanten erfolgte im Fluoreszenzmikroskop Axio Imager von Zeiss. **B) Lokalisation von Cdc14 in *tof2*-Deletionsmutanten mittels eines Cdc14 spezifischen Antikörpers.** Die Stämme K700 (WT), W4641 (*tof2-Δ::HIS3MX6*) und W4971 (*tof2-Δ::HIS3MX6*) wurden, wie bereits unter A) beschrieben, für eine indirekte Immunfluoreszenz aufgearbeitet (Fixierungszeit 2 min). Cdc14 wurde mittels eines polyklonalen Kaninchen Antikörpers gegen das Protein (Santa Cruz Biotechnology) und des sekundären anti-Kaninchen Alexa488 visualisiert. Eine Analyse der Cdc14 Lokalisation erfolgte wie bereits unter A) beschrieben.

4.3.2 Cdc14 und Tof2 sind delokalisiert in *net1-Δ* Mutanten

Um die Auswirkungen von Tof2 auf die Lokalisation von Cdc14 *in vivo* noch weiter zu analysieren, wurden die Lokalisationmuster beider Proteine in *net1*-Deletionsmutanten detektiert. Dies war jedoch schwierig, da Net1 eine wichtige Strukturkomponente des Nukleolus darstellt [Shou *et al.* 2001]. In *net1-Δ* Mutanten ist die Struktur des Nukleolus zerstört, was bedeutet, dass nicht nur Cdc14 delokalisiert ist, sondern auch andere nukleolare Proteine wie Nop1 und Nop2, die nicht über Net1 dort verankert werden. In einer indirekten Immunfluoreszenz wurde die Lokalisation von Cdc14^{h10} und Tof2^{m13} in *net1-Δ* Mutanten untersucht. Es ist zu erkennen, dass weder Cdc14 noch Tof2 in den *net1*-Deletionsmutanten im Nukleolus lokalisiert ist (Abbildung 4.13).

Aufgrund der Auswirkungen, die die Deletion von *NET1* auf die Struktur des Nukleolus hat, wurde nach Möglichkeiten gesucht, die Cdc14 Lokalisation in Mutanten zu analysieren, denen eine Bindung von Cdc14 an Net1 fehlt, deren nukleolare Struktur jedoch intakt ist, um beurteilen zu können, ob es trotz des Fehlens von Net1, das Cdc14 im Nukleolus verankert, zu einer partiell nukleolaren Lokalisation der Phosphatase kommt, was als Konsequenz der erhaltenen Ergebnissen durch Tof2 bewerkstelligt werden könnte. Die entsprechenden Vorgehensweisen werden in den Kapiteln 4.3.2.1 und 4.3.2.2 aufgezeigt.

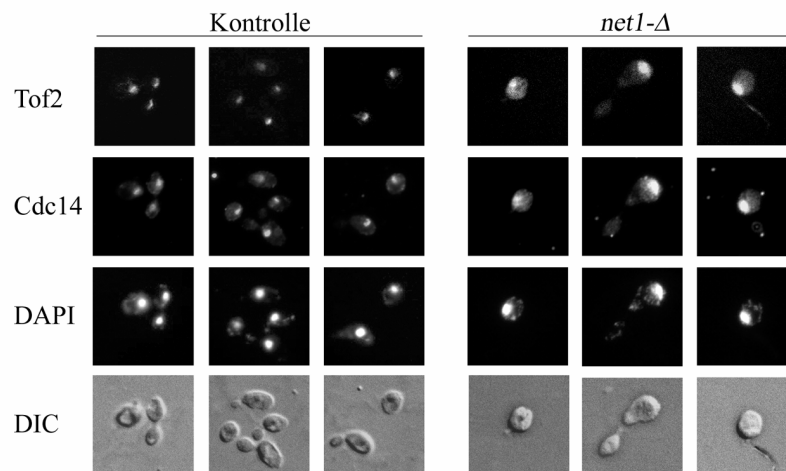


Abbildung 4.13: Lokalisation von Cdc14 und Tof2 in *net1-Δ* Mutanten

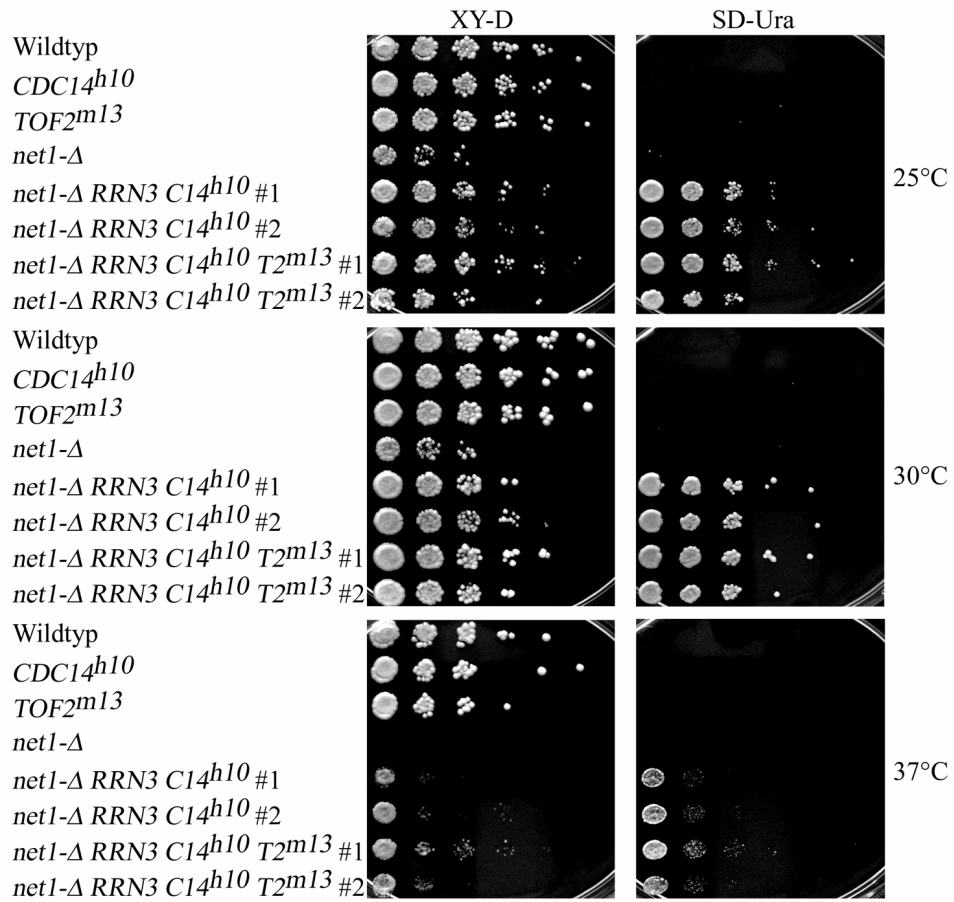
Die Stämme W4543 (*CDC14^{h10}-LEU2 TOF2^{m13}-HIS3MX6*) und W5825 (*net1-Δ::HIS3MX6 CDC14^{h10}-LEU2 TOF2^{m13}-NATMX4*) wurden in XY-D bei 25°C bis zur exponentiellen Wachstumsphase kultiviert. Asynchron wachsende Zellen wurden mit 4,5% Formaldehyd fixiert. Das ha-Epitop markierte Cdc14 wurde mittels des Kaninchen-anti-ha Antikörpers Y11 und des sekundären anti-Kaninchen Alexa488 sichtbar gemacht. Das myc-Epitop markierte Tof2 wurde mittels des Maus-anti-myc Antikörpers 9E10 und des sekundären anti-Maus Alexa546 visualisiert. Die DNA wurde durch DAPI angefärbt. Weiterhin ist in der Abbildung die Zellmorphologie (DIC) zu sehen. Die Analyse der Lokalisation von Cdc14 und Tof2 in *net1-Δ* Mutanten erfolgte im Fluoreszenzmikroskop Axio Imager von Zeiss.

4.3.2.1 Cdc14 und Tof2 sind delokalisiert in *net1-Δ* Mutanten nach der Transformation mit *RRN3*

Wie bereits in Kapitel 4.2.8 erwähnt, wurde in der Publikation von Shou *et al.* 2001 beschrieben, dass die Transformation der *net1-Δ* Mutanten mit *RRN3*, das für einen Transkriptionsaktivator der RNA Polymerase I codiert, bewirkt, dass die Wachstumsdefekte dieser Mutanten verringert sind und das nukleolare Protein Nop1 wieder teilweise im Nukleolus lokalisiert ist.

Daher wurden *net1*-Deletionsstämme hergestellt, die Epitop markiertes *CDC14^{h10}* sowie *TOF2^{m13}* exprimierten und zusätzlich ein ARS/CEN Plasmid enthielten mit *RRN3* unter der Kontrolle des konstitutiven *TEF2*-Promotors (pWS1765: *pTEF2-RRN3-tCYC1-URA3*). In Abbildung 4.14 A ist zu erkennen, dass das schlechte Wachstum der *net1-Δ* Mutanten durch zusätzliches *RRN3* verbessert wird. Daraufhin wurde die Lokalisation von Cdc14 und Tof2 in diesen Stämmen über indirekte Immunfluoreszenz untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.14 B zu sehen. Die Expression von zusätzlichem *RRN3* hat zwar einen positiven Effekt auf das Wachstumsverhalten der *net1-Δ* Mutanten, aber die Lokalisation von Cdc14 und Tof2 wird dadurch nicht beeinflusst. Beide Proteine sind in *net1-Δ* Mutanten mit und ohne zusätzlichem *RRN3* nicht mehr im Nukleolus lokalisiert.

A)



B)

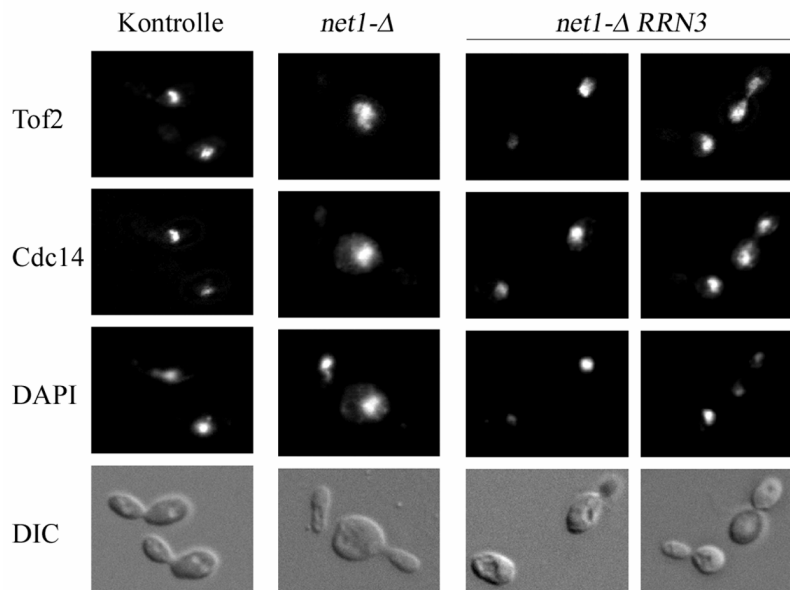


Abbildung 4.14: Wachstumsverhalten und Lokalisation von Cdc14 und Tof2 in *net1-Δ* Mutanten, die zusätzliches *RRN3* exprimieren

Abbildung 4.14: Wachstumsverhalten und Lokalisation von Cdc14 und Tof2 in *net1-Δ* Mutanten, die zusätzliches *RRN3* exprimieren

A) Wachstumsverhalten von *net1-Δ* Mutanten nach der Expression von zusätzlichem *RRN3*. Die Stämme W5689 (*net1-Δ::HIS3MX6 pTEF2-RRN3-tCYC1-URA3 CDC14^{h10}-LEU2* #1), W5690 (*net1-Δ::HIS3MX6 pTEF2-RRN3-tCYC1-URA3 CDC14^{h10}-LEU2* #2), W5810 (*net1-Δ::HIS3MX6 pTEF2-RRN3-tCYC1-URA3 CDC14^{h10}-LEU2 TOF2^{m13}-NATMX4* #1) und W5811 (*net1-Δ::HIS3MX6 pTEF2-RRN3-tCYC1-URA3 CDC14^{h10}-LEU2 TOF2^{m13}-NATMX4* #2) wurden auf ihre Wachstumsfähigkeit nach einer zusätzlichen Expression von *RRN3* getestet. Dazu wurden Verdünnungsreihen dieser Stämme in 1:10-er Schritten auf Vollmediumsplatten mit Glucose aufgebracht und 2 Tage bei 25°C, 30°C und 37°C inkubiert. Zusätzlich wurden Verdünnungen der Stämme auf SD-Ura Platten aufgetragen und bei den verschiedenen Temperaturen inkubiert. Als Kontrollen wurden die Stämme W4757 (*net1-Δ::HIS3MX6*), W1137 (*CDC14^{h10}-LEU2*), W5780 (*TOF2^{m13}-NATMX4*) und K699 (WT) eingesetzt. **B) Lokalisation von Cdc14 und Tof2 in *net1-Δ* Mutanten mit zusätzlichem *RRN3*.** Die Stämme W4543 (*CDC14^{h10}-LEU2 TOF2^{m13}-HIS3MX6*), W5825 (*net1-Δ::HIS3MX6 CDC14^{h10}-LEU2 TOF2^{m13}-NATMX4*) und W5811 (*net1-Δ::HIS3MX6 pTEF2-RRN3-tCYC1-URA3 CDC14^{h10}-LEU2 TOF2^{m13}-NATMX4*) wurden in XY-D bzw. SD-Ura bei 25°C bis zur exponentiellen Wachstumsphase kultiviert. Asynchron wachsende Zellen wurden mit 4,5% Formaldehyd fixiert. Das ha-Epitop markierte Cdc14 wurde mittels des Kaninchen-anti-ha Antikörpers Y11 und des sekundären anti-Kaninchen Alexa488 sichtbar gemacht. Das myc-Epitop markierte Tof2 wurde mittels des Maus-anti-myc Antikörpers 9E10 und des sekundären anti-Maus Alexa546 visualisiert. Die DNA wurde durch DAPI angefärbt. Abgebildet ist außerdem die Zellmorphologie (DIC). Die Analyse der Zellen erfolgte im Fluoreszenzmikroskop Axio Imager von Zeiss.

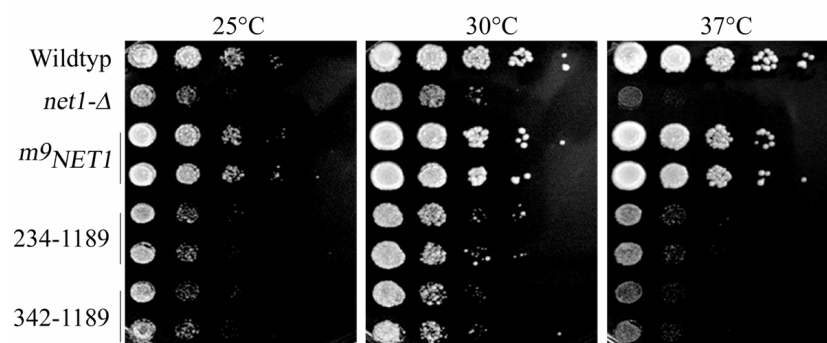
4.3.2.2 N-terminale Verkürzungen von Net1 sind delokalisiert

Net1 wird über Fob1 und eventuell über Pol1 im Nukleolus an der rDNA verankert [Huang & Moazed 2003]. In einer Publikation von Stegmeier *et al.* 2004 wird erwähnt, dass die nukleolare Verankerung von Net1 über Fob1 wahrscheinlich über den N-terminalen Bereich von Net1 erfolgt. Da die publizierten Daten der Net1 Verankerung im Nukleolus nur vage sind, wurden N-terminale Verkürzungen von Net1 hergestellt, um in diesen die Cdc14 Lokalisation zu untersuchen ohne die multiplen Effekte, die eine Deletion von *NET1* auf die Zellen hat, berücksichtigen zu müssen.

Durch PCR-vermittelte Epitopmarkierung nach Gauss *et al.* 2005 wurden N-terminale Verkürzungen von Net1 hergestellt. In einem Stamm wurden die ersten 233 Aminosäuren deletiert und in einem anderen die ersten 341 Aminosäuren. Als Positivkontrolle diente ein Stamm, der unverkürztes *NET1* exprimierte. Die Deletionen der N-terminalen Bereiche und die Markierung dieser verkürzten Proteine am N-Terminus mit einem myc9-Epitop wurden aufgrund des essentiellen Charakters von *NET1* in diploiden Stämmen durchgeführt. Bereits die Teradenanalyse zeigte, dass die Stämme mit den N-terminalen Verkürzungen von *NET1* kleine Kolonien bilden (Daten nicht gezeigt). Daraufhin wurde ein Wachstumstest durchgeführt, um die Wachstumsfähigkeit eines Wildtypstamms, einer *net1-Δ* Mutante und

der Stämme, die die N-terminalen Verkürzungen von *NET1* exprimieren, direkt miteinander vergleichen zu können. Abbildung 4.15 A zeigt, dass die Stämme mit den N-terminalen Verkürzungen von *NET1* ähnliche Wachstumsdefekte aufweisen wie die *net1-Δ* Mutante. Sie wachsen langsam bei 25°C und 30°C. Bei 37°C ist kein Wachstum möglich. Über indirekte Immunfluoreszenz wurde die Lokalisation der verkürzten Net1 Derivate analysiert (Abbildung 4.15 B). ^{m9}Net1 zeigt eine Lokalisation im Nukleolus, während die beiden verkürzten Derivate von Net1 im Zytoplasma lokalisieren, woraus zu schließen ist, dass der N-terminale Teil von Net1 für dessen Lokalisation im Nukleolus verantwortlich ist.

A)



B)

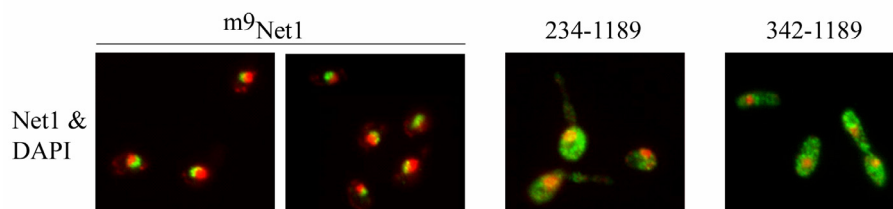


Abbildung 4.15: Wachstumstest und Lokalisation der N-terminal verkürzten Net1 Derivate

A) Wachstumsverhalten der Stämme mit N-terminalen Verkürzungen von *NET1*. Die Stämme K699 (WT), W4757 (*net1-Δ::HIS3MX6*), W6181 (^{m9}*NET1*), W6183 (^{m9}*NET1* 234-1189) und W6185 (^{m9}*NET1* 342-1189) wurden auf ihre Wachstumsfähigkeit getestet. Dazu wurden Verdünnungsreihen dieser Stämme in 1:10-er Schritten auf Vollmediumsplatten mit Glucose aufgebracht und 2 Tage bei 25°C, 30°C und 37°C inkubiert. **B) Lokalisation der verkürzten Net1 Derivate in der indirekten Immunfluoreszenz.** Die Stämme W6181 (^{m9}*NET1*), W6183 (^{m9}*NET1* 234-1189) und W6185 (^{m9}*NET1* 342-1189) wurden in XY-D bei 25°C bis zur exponentiellen Wachstumsphase kultiviert. Asynchron wachsende Zellen wurden mit 4,5% Formaldehyd fixiert. Das am N-Terminus mit einem myc-Epitop versehene Net1 und dessen N-terminale Verkürzungen wurde mittels des Maus-anti-myc Antikörpers 9E10 und des sekundären anti-Maus Alexa488 visualisiert. Die DNA wurde durch DAPI angefärbt. Zu sehen ist eine Überlagerung der DNA und Net1 Signale. Die Analyse der Lokalisation von ^{m9}Net1 und seinen N-terminalen Verkürzungen erfolgte im Fluoreszenzmikroskop Axio Imager von Zeiss.

Untersucht man die Lokalisation von Cdc14 über indirekte Immunfluoreszenz in heterozygot diploiden Stämmen, die neben den N-terminalen Verkürzung von *NET1* eine *NET1* Deletion aufweisen, kann, wie zu erwarten war, eine Delokalisation von Cdc14 detektiert werden. Cdc14 lokalisiert nicht mehr im Nukleolus, sondern im Zellkern (Abbildung 4.16). Auffällig ist jedoch, dass im Kontrollstamm mit dem Genotyp *net1-Δ/ m⁹NET1 CDC14^{h10} /CDC14* Cdc14 ebenfalls im Kern lokalisiert ist. Es wäre denkbar, wenn man den fünffachen Überschuss an Cdc14 gegenüber Net1 berücksichtigt, dass in diesen heterozygot diploiden Stämmen für *NET1* die anfallende Menge an Cdc14 nicht mehr im Nukleolus verankert werden kann.

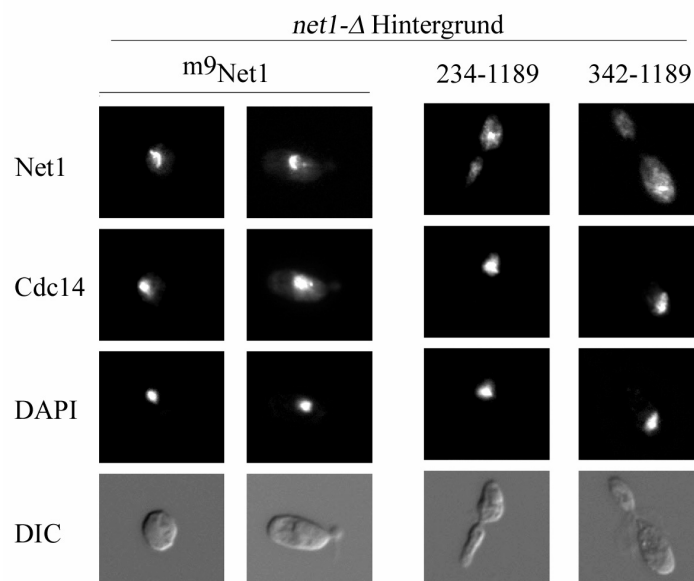


Abbildung 4.16: Lokalisation von Cdc14

Die Stämme W6682 (*net1-Δ::HIS3MX6/m⁹NET1 CDC14^{h10}-LEU2/CDC14*), W6683 (*net1-Δ::HIS3MX6/m⁹NET1 243-1189 CDC14^{h10}-LEU2/CDC14*) und W6684 (*net1-Δ::HIS3MX6/ m⁹NET1 342-1189 CDC14^{h10}-LEU2/CDC14*) wurden in XY-D bei 25°C bis zur exponentiellen Wachstumsphase kultiviert. Asynchron wachsende Zellen wurden mit 4,5% Formaldehyd fixiert. Das am N-Terminus mit einem myc-Epitop versehene Net1 und dessen N-terminale Verkürzungen wurden mittels des Kaninchen-anti-myc Antikörpers A14 und des sekundären anti-Kaninchen Alexa546 visualisiert. Cdc14^{h10} wurde mittels des Maus-anti-ha Antikörpers 12CA5 und des sekundären anti-Maus Alexa488 Antikörpers sichtbar gemacht. Die DNA wurde durch DAPI angefärbt. Abgebildet ist zudem die Zellmorphologie (DIC). Die Analyse der Lokalisation von Cdc14^{h10}, *m⁹Net1* und seinen N-terminalen Verkürzungen erfolgte im Fluoreszenzmikroskop Axio Imager von Zeiss.

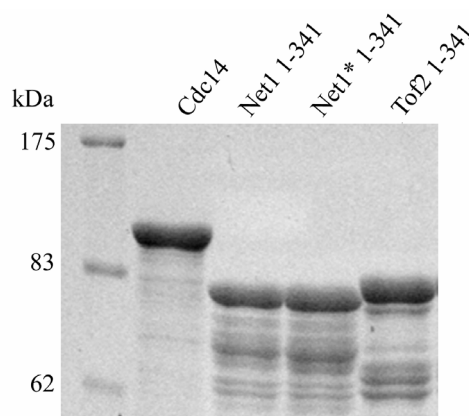
Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mittels der Analyse der Cdc14 Lokalisation in *tof2*- und *net1*-Deletionsmutanten keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob Tof2 einen zu Net1 alternativen permanenten Verankerungsmechanismus für Cdc14 im Nukleolus darstellt und an der Freisetzung der Phosphatase beteiligt ist, wobei die Lokalisationsstudien

von Cdc14 in den *tof2*-Deletionsmutanten dies eher ausschließen. Um einen detaillierten Einblick in den Verankerungs- und Regulationsmechanismus der Phosphatase Cdc14 durch Tof2 zu bekommen, wurden in den folgenden Kapiteln die Cdc14 Aktivität in Abhängigkeit von Tof2 *in vitro* und die *in vivo* Funktion des Net1-verwandten Proteins genauer analysiert.

4.4 *In vitro* Aktivität von Cdc14 in Abhängigkeit von Tof2 und Net1

Aufgrund der Sequenzähnlichkeiten im N-Terminus, die Tof2 und Net1 zueinander aufweisen, wurde *in vitro* die Phosphatase Aktivität in Abhängigkeit dieser N-terminalen Bereiche bestimmt. Es sollte getestet werden, ob ein N-terminales Fragment von Tof2 (^{mbp}Tof2 1-341) fähig ist, die Phosphatase Cdc14 zu inhibieren, in ähnlicher Weise wie es für den Phosphatase Inhibitor Net1 gezeigt werden konnte [Traverso *et al.* 2001]. Als Kontrolle diente ein N-terminales Fragment von Net1 (^{mbp}Net1 1-341). Darüber hinaus wurde in diesem experimentellen Ansatz ein Fragment von Net1 eingesetzt, das an Position 72 einen Aminosäureaustausch (R gegen G) aufweist (^{mbp}Net1* 1-341). *NET1** wurde über eine Zufallsmutagenese erhalten [Bücker 2006]. Das im N-terminalen Bereich mutierte Net1 ist noch in der Lage mit Cdc14 zu interagieren, eine Überexpression dieses Konstrukts ist jedoch weniger toxisch für Hefezellen, wobei die Toxizität der Überexpression von *NET1* durch die inhibitorische Wirkung von Net1 auf Cdc14 erklärt werden kann [Visintin *et al.* 1999].

^{mbp}*CDC14*, ^{mbp}*NET1* 1-341, ^{mbp}*NET1** 1-341 und ^{mbp}*TOF2* 1-341 wurden in *E. coli* exprimiert. Im Anschluss erfolgte die Aufreinigung der mbp-Fusionsproteine über eine Amylose Matrix (Abbildung 4.17).



4.17 Gereinigte mbp-Fusionsproteine

Ein *E. coli* Expressionsstamm (BL21-Codon+) wurde mit den folgenden Plasmide pWS1634 (*prhaBAD-malE-CDC14*), pWS1823 (*prhaBAD-malE-NET1* 1-341), pWS1825 (*prhaBAD-malE-NET1** 1-341) und pWS1827 (*prhaBAD-malE-TOF2* 1-341), die von dem Vektor pJoe2955 abstammten, transformiert. Durch Rhamnose (0,2%) wurde die Proteinexpression induziert. Nach dem Zellaufschluss über die French Press wurden die mbp-

Fusionsproteine über eine Amylose Matrix gereinigt und für eine Messung der Phosphatase Aktivität eingesetzt. Je 6 µl der gereinigten Proteine (entspricht circa 6-10 µg Protein) wurden auf ein 9%-iges SDS-Gel aufgetragen, das im Anschluss 1h mit RAPID-Stain™ gefärbt wurde.

Die auf diese Weise erhaltenen Proteine wurden für die Messung der Phosphatase Aktivität *in vitro* eingesetzt, wobei die Fähigkeit von ^{mbp}Cdc14 das chromogene Substrat para-Nitrophenylphosphat zu dephosphorylieren nach Zugabe von ^{mbp}Net1 1-341, ^{mbp}Net1* 1-341 oder ^{mbp}Tof2 1-341 gemessen wurde. Abbildung 4.18 A zeigt, dass die Cdc14 Aktivität nach der Zugabe steigender Mengen von ^{mbp}Net1 1-341 abnimmt. ^{mbp}Net1* 1-341 hat zwar auch eine inhibitorische Wirkung auf die Phosphatase, jedoch ist diese verringert, wenn man die Stärke der Inhibition des nicht mutierten N-terminalen Net1 Fragments im Vergleich betrachtet (Abbildung 4.18 A). Im Gegensatz dazu zeigt Abbildung 4.18 B, dass die Zugabe von ^{mbp}Tof2 1-341 einen positiven Effekt auf die Aktivität der Phosphatase hat. Diese stimulatorische Wirkung auf die Cdc14 Aktivität durch den N-terminalen Teil von Tof2 konnte auch für das unverkürzte Protein detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Gibt man zu der Phosphatase in einem Abstand von einer Minute zuerst das N-terminale Fragment von Net1 und darauf den N-terminalen Teil von Tof2 (+N +T) und umgekehrt (+T +N), wird die Aktivität der Phosphatase inhibiert (Abbildung 4.18 C). ^{mbp}Net1 1-341 scheint somit eine höhere Affinität auf die Phosphatase Cdc14 zu haben als ^{mbp}Tof2 1-341.

Trotz der Ähnlichkeiten, die zwischen den N-terminalen Teilen von Net1 und Tof2 bestehen, scheinen diese beiden Proteine in der Regulation der Phosphatase Cdc14 eine unterschiedliche Rolle zu spielen. Net1 inhibiert Cdc14, während Tof2 die Phosphatase Aktivität von Cdc14 *in vitro* stimuliert.

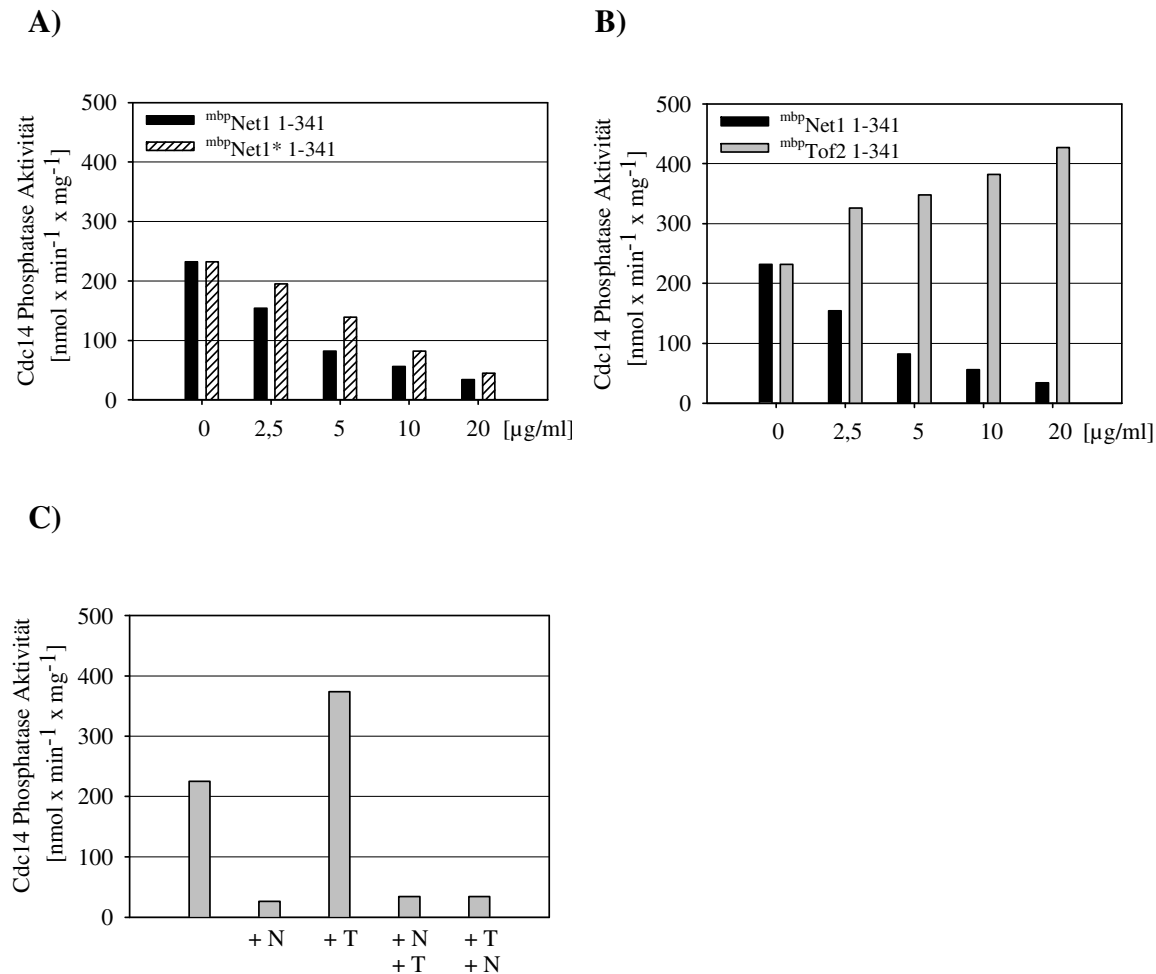


Abbildung 4.18: Messung der Cdc14 Aktivität in Abhängigkeit von ^{mbp}Net1 1-341, ^{mbp}Net1* 1-341 und ^{mbp}Tof2 1-341

Rekombinantes ^{mbp}CDC14 (pWS1634), ^{mbp}NET1 1-341 (pWS1823), ^{mbp}NET1* 1-341 (pWS1825) und ^{mbp}TOF2 1-341 (pWS1827) wurden in *E. coli* exprimiert, über eine Amylose Bindungsmatrix aufgereinigt und zur Messung der Phosphatase Aktivität *in vitro* eingesetzt. para-Nitrophenylphosphat (p-NPP) diente der Phosphatase Cdc14 als Substrat [Taylor *et al.* 1997]. Zunächst wurde die Aktivität von ^{mbp}Cdc14 ohne die Zugabe der N-terminalen Teile von Net1, Net1* oder Tof2 bestimmt und dann nach der Zugabe der entsprechenden aufgereinigten Proteinbereiche. Für jede Aktivitätsbestimmung der Phosphatase wurde ^{mbp}Cdc14 in einer Konzentration von 5 μg/ml eingesetzt. Die Aktivität wurde photometrisch bei 405 nm gemessen. **A) & B) Wirkung von ^{mbp}Net1 1-341, ^{mbp}Net1* 1-341 oder ^{mbp}Tof2 1-341 auf die Cdc14 Aktivität.** ^{mbp}Net1 1-341, ^{mbp}Net1* 1-341 oder ^{mbp}Tof2 1-341 wurden in steigenden Mengen zu ^{mbp}Cdc14 gegeben und die Aktivität der Phosphatase nach einer 15-minütigen Inkubation bei 30°C photometrisch bestimmt. **C) Wirkung von ^{mbp}Net1 1-341 und ^{mbp}Tof2 1-341 auf die Cdc14 Aktivität.** Zu ^{mbp}Cdc14 wurden ^{mbp}Net1 1-341 (+ N, 20 μg/ml) oder ^{mbp}Tof2 1-341 (+ T, 20 μg/ml) gegeben bzw. wurden die N-terminalen Bereiche von Net1 und Tof2 kurz nacheinander mit der Phosphatase inkubiert (+N +T; +T +N, je 20 μg/ml).

4.5 *In vivo* Funktion von Tof2

4.5.1 *In vivo* Vergleich von Tof2 und Net1

Basierend auf der Grundlage der *in vitro* Daten, sollten Funktionsähnlichkeiten von Tof2 und Net1 die Inhibition der Phosphatase Cdc14 betreffend noch zusätzlich *in vivo* untersucht werden. Dazu wurden zwei genetische Ansätze gewählt, die in den Kapiteln 4.5.1.1 und 4.5.1.2 näher erläutert werden.

4.5.1.1 Eine *tof2-Δ* Mutante supprimiert nicht den Phänotyp einer *cdc15-2* Mutante

Cdc15 ist eine Kinase des MEN und somit an der Freisetzung von Cdc14 innerhalb der späten Anaphase beteiligt. Komponenten des MEN sind essentiell, Mutationen innerhalb dieser Komponenten führen zu einem Arrest in der späten Anaphase/frühen Telophase. Die Zellen sind nicht fähig aus der Mitose auszutreten, da die Freisetzung größerer Mengen von Cdc14 zu diesem Zeitpunkt der Mitose nicht bewerkstelligt werden kann. *cdc15-2* ist ein temperatursensitives Allel, was bedeutet, dass Zellen, die dieses Allel tragen bei niedrigen Temperaturen 25°C und auch 30°C wachsen können. Bei höheren Temperaturen wirkt sich die Mutation aus und die Zellen zeigen einen Anaphase/Telophase Arrest. Net1 wurde ursprünglich durch die Fähigkeit seiner Deletionsmutante MEN Mutanten zu supprimieren identifiziert [Shou *et al.* 1999]. In der *net1-Δ* Mutante ist Cdc14 nicht mehr im Nukleolus verankert und wird somit nicht mehr inhibiert, so dass der Arrest innerhalb des Zellzyklus, den MEN Mutanten zeigen, aufgehoben werden kann. Daher sollte die Fähigkeit einer *tof2-Δ* Deletionsmutante, den Arrest Phänotyp einer *cdc15-2* Mutante zu unterdrücken, getestet werden. Einzelmутanten, die das *cdc15-2* Allel aufwiesen, eine *TOF2* Deletion oder eine Deletion von *NET1* und die entsprechenden Doppelmutanten (*tof2-Δ cdc15-2*, *net1Δ cdc15-2*) wurden auf XY-D Platten aufgebracht, um ihr Wachstum bei unterschiedlichen Temperaturen untersuchen zu können. In Abbildung 4.19 ist deutlich zu erkennen, dass ein Wachstum der *cdc15-2* Mutante bei 34°C und 37°C nicht möglich ist. Die *net1-Δ* Mutante wächst langsam bei 25°C, 30°C und 34°C. Bei 37°C sind die Zellen, die die *NET1* Deletion tragen, nicht fähig zur Koloniebildung, aufgrund der multiplen Effekte von Net1 innerhalb der Regulation der Mitose und der Organisation der Nukleolusstruktur. Die *tof2-Δ* Mutante weist keine Wachstumsdefizite bei den unterschiedlichen Temperaturen auf.

Die Wachstumsanalyse der Doppelmutanten zeigt, dass die *NET1* Deletion, wie publiziert, den Arrest des *cdc15-2* Allels unterdrücken kann, *net1-Δ cdc15-2* Doppelmutanten können sowohl bei 34°C als auch bei 37°C wachsen. Ein Wachstum der Doppelmutante, die die

TOF2 Deletion und das temperatursensitive Allel *cdc15-2* trägt, ist bei höheren Temperaturen nicht möglich, sie verhält sich wie eine *cdc15-2* Einzelmutante. Einer *tof2*-Deletionsmutante ist es also im Unterschied zu einer *net1*-Deletionsmutante nicht möglich den temperatursensitiven Charakter einer *cdc15-2* Mutante zu supprimieren.

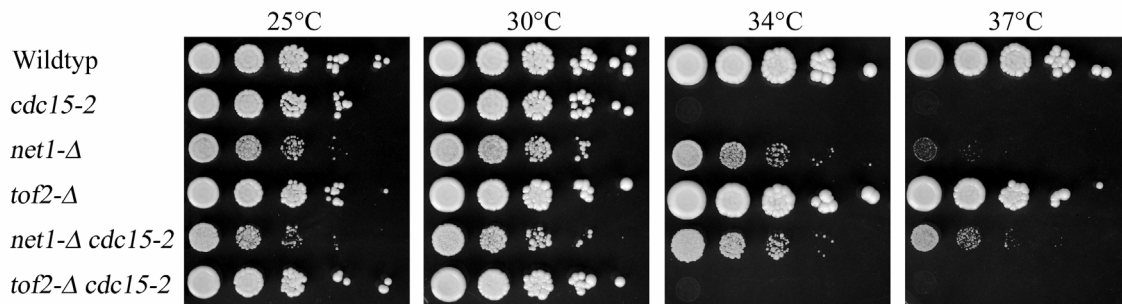


Abbildung 4.19: Wachstumstest der *cdc15-2*, *net1-Δ*, *tof2-Δ* Einzelmutanten und der entsprechenden Doppelmutanten

Die Stämme W9313 (*cdc15-2*), W4757 (*net1-Δ::HIS3MX6*), W4971 (*tof2-Δ::HIS3MX6*), W6443 (*net1-Δ::HIS3MX6 cdc15-2*), W4765 (*tof2-Δ::HIS3MX6 cdc15-2*) und K700 (WT) wurden auf ihre Wachstumsfähigkeit getestet. Dazu wurden Verdünnungsreihen dieser Stämme in 1:10-er Schritten auf Vollmediumsplatten mit Glucose aufgebracht und 2 Tage bei 25°C, 30°C, 34°C und 37°C inkubiert.

4.5.1.2 Eine *TOF2* Überexpression ist nicht toxisch für die Hefe *S. cerevisiae*

Innerhalb dieses Experiments sollte eine Überexpression von *TOF2* und *NET1* vergleichend betrachtet werden, basierend auf bereits publizierten Daten, die zeigten, dass eine Überexpression von *NET1* toxisch ist für Hefezellen [Visintin *et al.* 1999]. Zellen, die *NET1* überexprimieren arretieren in der späten Anaphase/frühen Telophase aufgrund der inhibitorischen Wirkung von Net1 auf die Phosphatase Cdc14.

TOF2^{m13} und *NET1^{m9}* wurden aus dem Hefegenom amplifiziert und unter der Kontrolle eines Galaktose-Promotors (*GAL1*-Promotor) am *LEU2* Marker in Hefe durch homologe Rekombination in multiplen Kopien integriert.

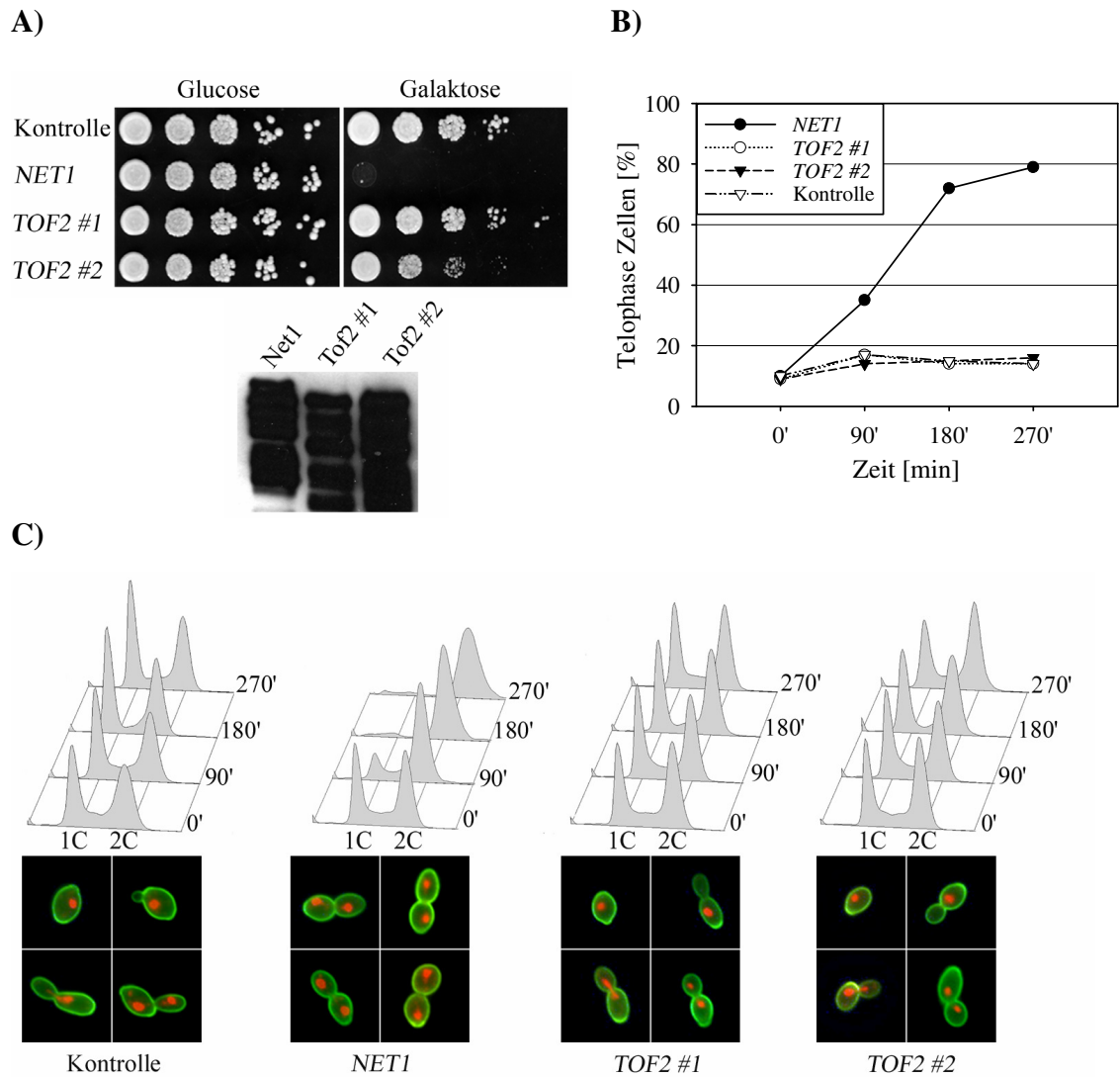


Abbildung 4.20: Analyse der Überexpression von TOF2 und NET1

A) Wachstumstest nach Überexpression von TOF2 und NET1. Die Stämme W6595 (*leu2::pGAL1-NET1^{m9}-tCYC1-LEU2*), W6598 (*leu2::pGAL1-TOF2^{m13}-tCYC1-LEU2* #1) und W6599 (*leu2::pGAL1-TOF2^{m13}-tCYC1-LEU2* #2) wurden auf ihre Wachstumsfähigkeit nach der Überexpression von TOF2^{m13} oder NET1^{m9} getestet. Dazu wurden Verdünnungsreihen dieser Stämme in 1:10-er Schritten auf Vollmediumsplatten mit Glucose oder Galaktose aufgebracht und 2 Tage bei 25°C inkubiert. Als Kontrolle wurde der Stamm W5620 (*leu2::pGAL1-tCYC-LEU2*) eingesetzt. In einer Western-Blot-Analyse wurden die Mengen von Net1^{m9}, ToF2^{m13} #1 oder ToF2^{m13} #2 3 h nach der Induktion mit Galaktose miteinander verglichen. Dazu wurden die exponentiell wachsenden Zellen (XY-Raf 2%, 25°C) der Stämme W6595 (*leu2::pGAL1-NET1^{m9}-LEU2*), W6598 (*leu2::pGAL1-TOF2^{m13}-LEU2* #1) und W6599 (*leu2::pGAL1-TOF2^{m13}-LEU2* #2) mit 2% Galaktose induziert (3h, 25°C) und anschließend für eine Western-Blot-Analyse aufgearbeitet. Eine Integrationszahl-PCR zeigte, dass sowohl *pGAL1-NET1^{m9}* als auch *pGAL1-TOF2^{m13}* #1 und #2 in multiplen Kopien am *LEU2* Marker integriert sind (Daten nicht gezeigt). **B) & C) Mikroskopisch und durchflußzytometrische Analysen nach Überexpression von TOF2 und NET1.** Die Stämme W6595 (*leu2::pGAL1-NET1^{m9}-tCYC1-LEU2*), W6598 (*leu2::pGAL1-TOF2^{m13}-tCYC1-LEU2* #1) und W6599 (*leu2::pGAL1-TOF2^{m13}-tCYC1-LEU2* #2) wurden in XY-Raf (2%) bei 25°C kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase mit 2% Galaktose induziert. Nach 0 min, 90 min, 180 min und 270 min wurden Proben genommen und ethanolfixiert. Diese Proben wurden für

mikroskopische Untersuchungen und die Analyse des DNA-Gehalts (G1 = 1C, M-Phase = 2C) im Durchflußzytometer eingesetzt. Für die Analyse der ethanolfixierten Proben im Fluoreszenzmikroskop wurde die Zellwand mit ConA-FITC angefärbt und die DNA mittels DAPI.

Der Wachstumstest in Abbildung 4.20 A zeigt, dass übereinstimmend mit den publizierten Daten die Stämme mit dem Überexpressionskonstrukt von *NET1* nicht fähig sind, Kolonien auf der Vollmediumsplatte mit Galaktose zu bilden. Des Weiteren zeigen mikroskopische und durchflußzytometrische Analysen, dass die Zellen nach einer Überexpression von *NET1* mit replizierter DNA und getrennten Kernen arretieren (Abbildung 4.20 B & C). Im Gegensatz dazu ist eine Überexpression von *TOF2* nicht toxisch für Hefezellen. Zellen, die das Überexpressionskonstrukt von *TOF2* enthalten, sind in der Lage auf Galaktose-Platten zu wachsen (Abbildung 4.20 A). Wird extrem viel *TOF2* exprimiert, zeigen die Zellen zwar leichte Wachstumsbeeinträchtigungen (*pGAL1-TOF2^{ml3}* #2, Abbildung 4.20 A), es findet jedoch keine Akkumulation an Telophase Zellen statt (Abbildung 4.20 B & C). Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass auch die Expression von extrem hohen Mengen an *TOF2* keinen Phänotyp zeigt, der auf eine Inhibition der Phosphatase Cdc14 hinweist.

4.5.2 Tof2 unterstützt die biologische Funktion von Cdc14 *in vivo*

Der Vergleich von Tof2 und Net1 *in vivo* zeigt, dass Tof2 im Unterschied zu Net1 kein Inhibitor der Phosphatase Cdc14 ist. Daraufhin sollte *in vivo* überprüft werden, ob Tof2 als ein Aktivator von Cdc14 agiert in Anlehnung an seine stimulierende Wirkung auf Cdc14 *in vitro*.

4.5.2.1 Cdc14 Lokalisation nach der Überexpression von *TOF2*

Im Unterschied zu der *net1*-Deletionsmutante, war es der *tof2-Δ* Mutante nicht möglich den *cdc15-2* Arrest Phänotyp zu supprimieren (Abbildung 4.19). Auch in der Analyse der *TOF2* Überexpression verhielt sich Tof2 nicht wie ein Inhibitor von Cdc14 (Abbildung 4.20). *In vitro* konnte bereits gezeigt werden, dass Tof2 Cdc14 im Unterschied zu Net1 nicht inhibiert, sondern die Phosphatase Aktivität stimuliert (Abbildung 4.18), so dass man annehmen könnte, dass Tof2 auch *in vivo* die Aktivität von Cdc14 unterstützt. Eine Überexpression von *TOF2* sollte daher die *cdc15-2* Mutante supprimieren, was auch tatsächlich der Fall ist (persönliche Mitteilung Michael Schwab). Der Stamm, der *TOF2* in einer extrem hohen Menge exprimiert und leichte Wachstumsdefizite auf Galaktose zeigt (Abbildung 4.20 A), ist in der Lage, die Temperatursensitivität der *cdc15-2* Mutante bei 34°C und 37°C aufzuheben.

Um die Auswirkungen der *TOF2* Überexpression auf die Cdc14 Lokalisation zu testen, wurde eine indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt. Die Stämme, die am *LEU2*-Marker in mehreren Kopien epitopmarkiertes *TOF2* unter dem *GALI*-Promotor aufweisen (Kapitel 4.5.1.2), wurden mit Hilfe eines Cdc14 spezifischen Antikörpers nach Induktion der *TOF2* Überexpression in der Immunfluoreszenz analysiert. Außerdem wurde in einer weiteren Immunfluoreszenz die Nukleolusstruktur über das nukleolare Net1 nach Überexpression von *TOF2* untersucht. Dazu wurde ein Stamm verwendet, der nicht epitopmarkiertes *TOF2* unter der Kontrolle des Galaktose-Promotors enthielt und myc-Epitop markiertes *NET1* exprimierte.

In Abbildung 4.21 A ist beispielhaft für beide Stämme, die die *TOF2* Überexpressionskonstrukte enthalten, der Stamm gezeigt, der die größere Menge an *TOF2* exprimiert und in der Lage ist die *cdc15-2* Mutante zu supprimieren, da sich nach der Überexpression von *TOF2* für beide Stämme ein vergleichbares Lokalisationsmuster von Cdc14 ergab. Es ist zu erkennen, dass Tof2 nach seiner Überexpression im Zellkern lokalisiert (Abbildung 4.21 A). Außerdem führt die *TOF2* Überexpression zu einer Delokalisation der Phosphatase Cdc14, die mit Tof2 im Zellkern colokalisiert werden kann (Abbildung 4.21 A). Die Kernlokalisation von Cdc14 nach einer *TOF2* Überexpression wird nicht ausschließlich von Tof2 bewerkstelligt wie in Abbildung 4.21 B zu sehen ist. Die Überexpression von *TOF2* bewirkt nämlich, dass auch Net1 im Zellkern lokalisiert und hat somit einen Einfluss auf die nukleolare Integrität. Diese Beobachtung könnte eine Erklärung dafür sein, dass nur der Stamm, der die größere Menge an *TOF2* exprimiert, zu einer Suppression der *cdc15-2* Mutante führt, da eine besonders hohe Menge an Tof2 benötigt wird, um der inhibitorischen Wirkung des delokalisierten Net1 auf die ebenfalls im Kern lokalisierte Phosphatase Cdc14 entgegenzuwirken.

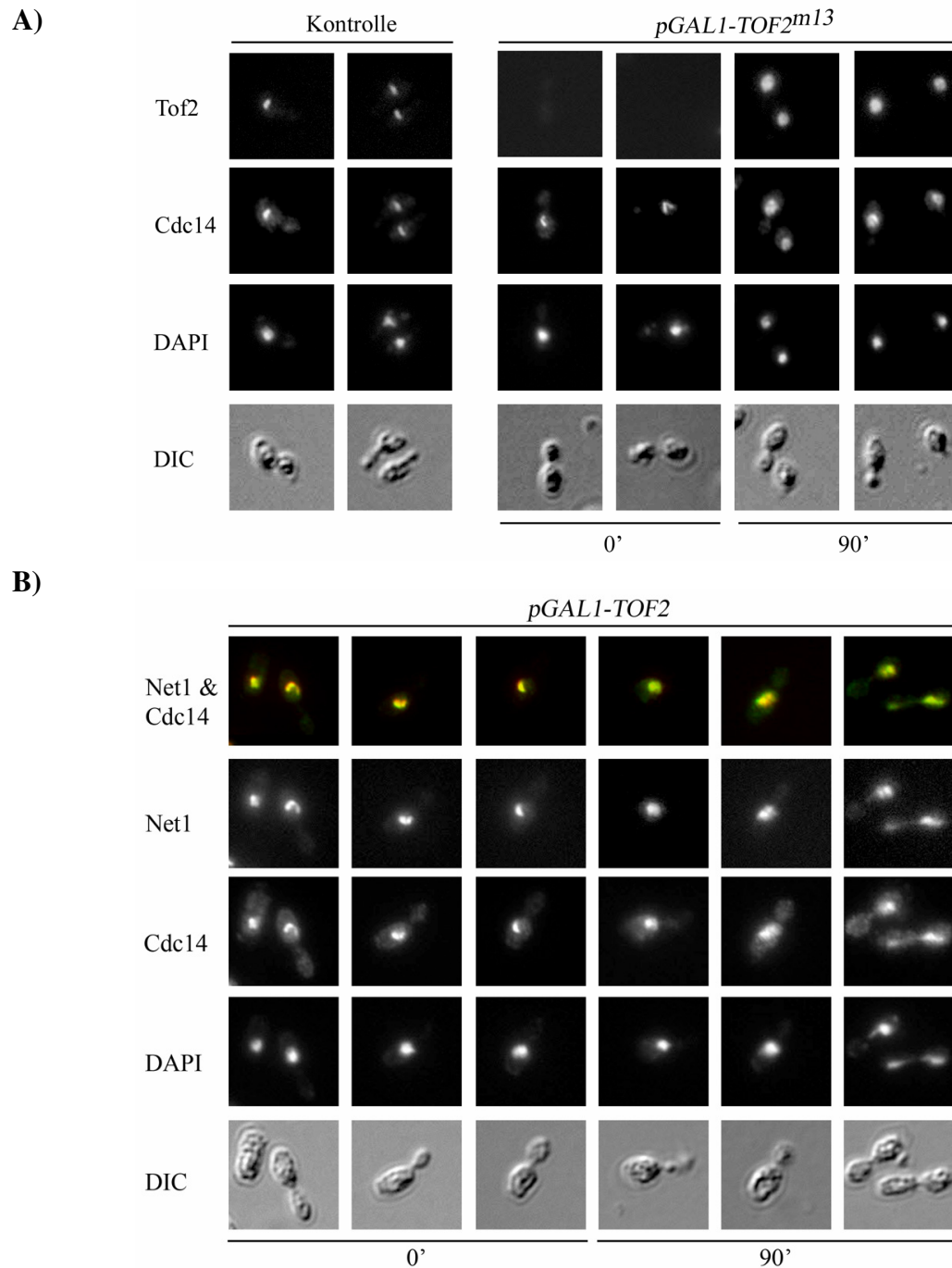


Abbildung 4.21: Analysen der Cdc14 Lokalisation und der Nukleolusstruktur nach Überexpression von *TOF2*

A) Analyse der Cdc14 Lokalisation. Der Stamm W6599 (*leu2::pGAL1-TOF2^{m13}-tCYC1-LEU2 #2*) wurde bis zur exponentiellen Wachstumsphase in XY-R kultiviert und mit 2% Galaktose induziert. Nach 0 und 90 min wurden Proben genommen und mit Formaldehyd fixiert. Cdc14 wurde mittels eines polyklonalen Kaninchen Antikörpers gegen das Protein (Santa Cruz Biotechnology) und des sekundären anti-Kaninchen Alexa488 sichtbar gemacht. Das myc-Epitop markierte Tof2 wurde mittels eines Maus-anti-myc Antikörpers 9E10 und des sekundären anti-Maus Alexa546 visualisiert. Die DNA wurde durch DAPI angefärbt. Abgebildet ist auch die Zellmorphologie (DIC). Die Analyse der Zellen erfolgte im Fluoreszenzmikroskop Axio Imager von Zeiss. **B) Analyse der Nukleolusstruktur.** Der Stamm W7045 (*^{m9}NET1-TRP1/NET1 leu2::pGAL1-TOF2-LEU2*) wurde für eine indirekte Immunfluoreszenz aufgearbeitet und analysiert (Abbildung 4.21 A). Zu sehen sind die

Net1, Cdc14 und DNA Signale (DAPI), sowie die Zellmorphologie (DIC) und eine Überlagerung der Net1 und Cdc14 Signale.

4.5.2.2 Genetische Interaktionen der *tof2*-Deletionsmutante

Die Beobachtung, dass Tof2 Cdc14 auch *in vivo* aktiviert, wird noch dadurch manifestiert, dass die Deletion von *TOF2*, deren Wachstum bei unterschiedlichen Temperaturen unbeeinträchtigt ist, mit einem funktionsbeeinträchtigten Allel von *CDC14* (*cdc14-3*, temperatursensitiv) bei 25°C eine synthetische Letalität zeigt (Abbildung 4.22). *cdc14-3* Mutanten arretieren in der späten Anaphase/frühen Telophase bei restriktiver Temperatur. Doppelmutanten, die eine *TOF2* Deletion und das temperatursensitive *cdc14-3* Allel tragen, sind bereits bei permissiver Temperatur nicht lebensfähig. Auch dieses Ergebnis weist darauf hin, dass Tof2 eine oder mehrere biologische Funktion von Cdc14 *in vivo* unterstützt.

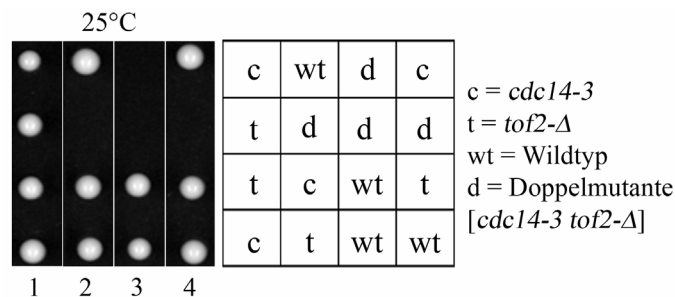


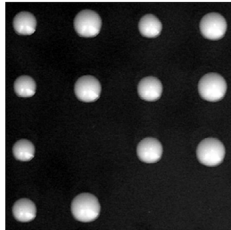
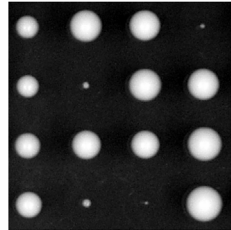
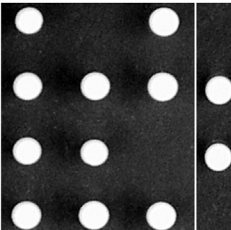
Abbildung 4.22: Tetradenanalyse von *TOF2/tof2-Δ CDC14/cdc14-3*

Tetrade 1 zeigt den parentalen Dityp, Tetrade 2 und 4 den Tetratyp und Tetrade 3 den nicht-parentalen Dityp. Die Stämme W4971 (*tof2-Δ::HIS3MX6*) und CY682 (*cdc14-3*) wurden gekreuzt und anschließend zur Sporulation gebracht. Nach der Trennung der Sporen auf Vollmediumsplatten mit Glucose wurden diese bei 25°C für 3 Tage inkubiert. 16 Tetraden wurden analysiert, die keine *cdc14-3 tof2-Δ* Nachkommen zeigten.

Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die *TOF2* Deletion mit verschiedenen Epitop markierten Allelen von *CDC14* synthetische Effekte zeigt (Tabelle 4.1). Die Analyse des Phänotyps extrem kranker Mutanten, die neben der *TOF2* Deletion noch ha4-Epitop markiertes *CDC14* aufwiesen, konnte nicht dazu beitragen, dass eine Aussage über die molekulare Funktion von Tof2 in der Regulation der Phosphatase Cdc14 gemacht werden konnte. Der Phänotyp dieser Zellen war uneinheitlich, sie waren teilweise extrem groß mit zerstörten Zellkernen und auffälligen Mikrotubulistrukturen (Daten nicht gezeigt).

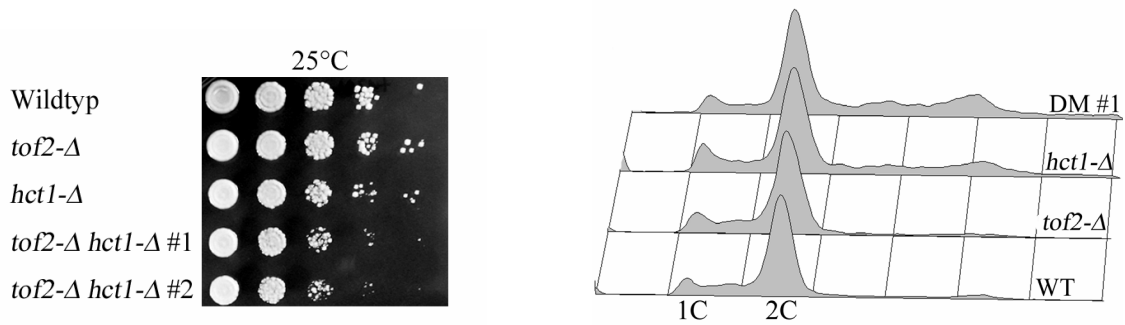
Tabelle 4.1: Synthetische Effekte der *TOF2* Deletion mit epitopmarkierten *CDC14* Allelen

Die *tof2*-Deletionsmutanten (W4641, W4971) wurde mit Stämmen gekreuzt, die epitopmarkierte *CDC14* Allele (W1137, W1658, W5096) enthielten und sporuliert. Nach der Trennung der Sporen auf Vollmediumsplatten mit Glucose wurden diese bei 25°C inkubiert. wt = Wildtyp, d = Doppelmutante, t = *tof2-Δ*, c = epitopmarkiertes *CDC14*

<p>W1137 x W4971</p>  <table><tr><td>t</td><td>t</td><td>c</td><td>wt</td></tr><tr><td>c</td><td>c</td><td>wt</td><td>c</td></tr><tr><td>c</td><td>d</td><td>t</td><td>t</td></tr><tr><td>t</td><td>wt</td><td>d</td><td>d</td></tr></table> <p>1 2 3 4</p>	t	t	c	wt	c	c	wt	c	c	d	t	t	t	wt	d	d	<p><i>tof2-Δ CDC14^{h10}</i></p>	<p>synthetisch letal</p>
t	t	c	wt															
c	c	wt	c															
c	d	t	t															
t	wt	d	d															
<p>W1658 x W4971</p>  <table><tr><td>t</td><td>wt</td><td>t</td><td>d</td></tr><tr><td>c</td><td>d</td><td>wt</td><td>wt</td></tr><tr><td>t</td><td>wt</td><td>c</td><td>t</td></tr><tr><td>c</td><td>d</td><td>d</td><td>c</td></tr></table> <p>1 2 3 4</p>	t	wt	t	d	c	d	wt	wt	t	wt	c	t	c	d	d	c	<p><i>tof2-Δ CDC14^{h4}</i></p>	<p>synthetisch krank</p>
t	wt	t	d															
c	d	wt	wt															
t	wt	c	t															
c	d	d	c															
<p>W5096 x W4641</p>  <table><tr><td>t</td><td>d</td><td>wt</td><td>d</td></tr><tr><td>c</td><td>t</td><td>c</td><td>wt</td></tr><tr><td>c</td><td>c</td><td>d</td><td>wt</td></tr><tr><td>t</td><td>wt</td><td>t</td><td>d</td></tr></table> <p>1 2 3 4</p>	t	d	wt	d	c	t	c	wt	c	c	d	wt	t	wt	t	d	<p><i>tof2-Δ CDC14^{m9}</i></p>	<p>synthetisch letal</p>
t	d	wt	d															
c	t	c	wt															
c	c	d	wt															
t	wt	t	d															

Weiterhin konnten schwache synthetische Effekte der *TOF2* Deletion mit den Deletionen von *HCT1* und *LTE1* aufgezeigt werden (Abbildung 4.23). Hct1 wird durch Cdc14 dephosphoryliert [Jaspersen *et al.* 1999]. Dies hat die Entstehung eines aktiven APC/Hct1 Komplexes zur Folge, der zur Degradation mitotischer Zykline führt. Lte1 ist ein positiver Regulator des MEN, da es als GEF den Austausch von an Tem1 gebundenem GDP gegen GTP katalysieren könnte, was eine Aktivierung des *mitotic exit network* nach sich zieht [Simanis *et al.* 2003, Piatti *et al.* 2006].

A)



B)

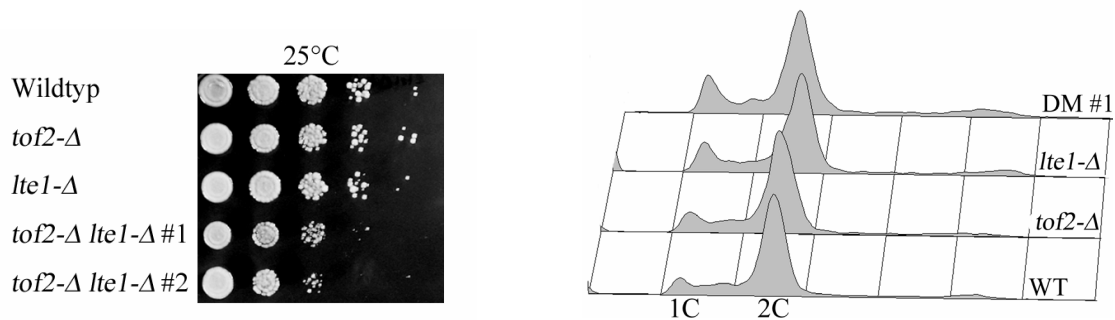


Abbildung 4.23: Wachstumstest und Durchflußzytometrie der Doppelmutanten *tof2-Δ hct1-Δ* und *tof2-Δ lte1-Δ*

Verdünnungsreihen wurden in 1:10-er Schritten auf Vollmediumsplatten mit Glucose aufgebracht und 2 Tage bei 25°C inkubiert. Für die Analyse im Durchflußzytometer wurden die Stämme in XY-D Medium bei 25°C bis zur exponentiellen Wachstumsphase kultiviert und mit Ethanol fixiert. Die ethanolfixierten Stämme wurden für die Durchflußzytometrie aufgearbeitet. Abgebildet ist der DNA-Gehalt der Zellen (G1 = 1C; M-Phase = 2C). **A) Analyse der Doppelmutanten *tof2-Δ hct1-Δ*.** Die Stämme W4641 (*tof2-Δ::HIS3MX6*), W320 (*hct1-Δ::LEU2*), W5225 (*tof2-Δ::HIS3MX6 hct1-Δ::LEU2* #1), W5226 (*tof2-Δ::HIS3MX6 hct1-Δ::LEU2* #2) und K699 (WT) wurden für den Teil A) des Experiments herangezogen. Wobei DM #1 für die Doppelmutante #1 W5225 steht. **B) Analyse der Doppelmutanten *tof2-Δ lte1-Δ*.** Die Stämme W4641 (*tof2-Δ::HIS3MX6*), W1888 (*lte1-Δ::HIS3MX6*), W5301 (*tof2-Δ::NATMX4 lte1-Δ::HIS3MX6* #1), W5302 (*tof2-Δ::NATMX4 lte1-Δ::HIS3MX6* #2) und K699 (WT) wurden für den Teil B) des Experiments benutzt. DM #1 steht für Doppelmutante #1 W5301.

Untersuchungen der Einzel- und Doppelmutanten machten deutlich, dass die *tof2-Δ hct1-Δ* und *tof2-Δ lte1-Δ* Doppelmutanten eine leichte phänotypische Veränderung hinsichtlich ihrer Wachstumsfähigkeit aufweisen (Abbildung 4.23 A & B, Wachstumstests). Die Bestimmung des DNA-Gehalts bestätigte die schwachen phänotypischen Auswirkungen der Doppelmutationen. In der Abbildung 4.23 A & B (Profile der Durchflußzytometrie) ist zu sehen, dass die jeweiligen Einzelmutanten *hct1-Δ* und *lte1-Δ* einen DNA-Gehalt aufweisen, der größer als der 2C DNA-Gehalt ist. Diese Mutanten zeigen eine Knospenbildung und erneute Kernteilung, noch bevor sich die alte Knospen von der Mutterzelle abgetrennt hat

(Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung scheint in den Doppelmutanten *tof-2Δ hct1-Δ* und *tof2-Δ lte1-Δ* geringfügig verstärkt zu sein (Abbildung 4.23 A & B, Profile der Durchflußzytometrie).

Zusammenfassend machte der Vergleich von Net1 und Tof2 *in vivo* deutlich, dass trotz der Ähnlichkeiten dieser beiden Proteine, was die N-terminale Proteinsequenz und die Interaktion dieses Bereichs mit Cdc14 betrifft, keine Funktionsähnlichkeiten vorliegen. Net1 ist ein Inhibitor der Phosphatase Cdc14, während Tof2 *in vitro* die Cdc14 Aktivität stimuliert und auch *in vivo* die biologische Funktion von Cdc14 zu unterstützt.

4.5.3 Phänotyp und Zellzyklusprogression der *tof2*-Deletionsmutante

Jüngste Studien zeigten [Park & Sternglanz 1999, Collins *et al.* 2007, Pan *et al.* 2006], dass die Deletion von *TOF2* eine Reihe genetischer Effekte aufweist. Neben den in dieser Arbeit beschriebenen synthetischen Effekten der *tof2*-Deletionsmutante mit beeinträchtigten *CDC14* Allelen, der *HCT1*- und *LTE1* Deletion, konnten noch weitere genetische Interaktionen aufgezeigt werden. Der Phänotyp der Einzelmutterante ist jedoch unauffällig [Park & Sternglanz 1999]. Mutanten mit einer *TOF2* Deletion zeigen weder Wachstumsdefizite bei 30°C und 37°C noch Auffälligkeiten in den Profilen der Durchflußzytometrie, wobei asynchron wachsende Kulturen analysiert wurden (Abbildung 4.24 A & B). Auch die Lokalisation der Phosphatase Cdc14 scheint in *tof2*-Deletionsmutanten nicht beeinträchtigt zu sein (Kapitel 4.3.1). Jedoch wurde in mikroskopischen Analysen asynchroner Kulturen deutlich, dass der Anteil an Zellen mit einer Knospe und zwei getrennten Kernen in *tof2*-Deletionsmutanten geringfügig erhöht ist (Abbildung 4.24 C). Weiterhin wurde der Austritt aus der Mitose in einer synchron wachsenden Kultur von *tof2*-Deletionsmutanten untersucht, indem die Clb2 Abnahme und Sic1 Zunahme mit Protein-spezifischen Antikörpern detektiert wurde. Dazu wurden die Zellen durch Abschalten der Cdc20 Funktion und anschließende Rekonstitution synchronisiert (Kapitel 7.2.2.2).

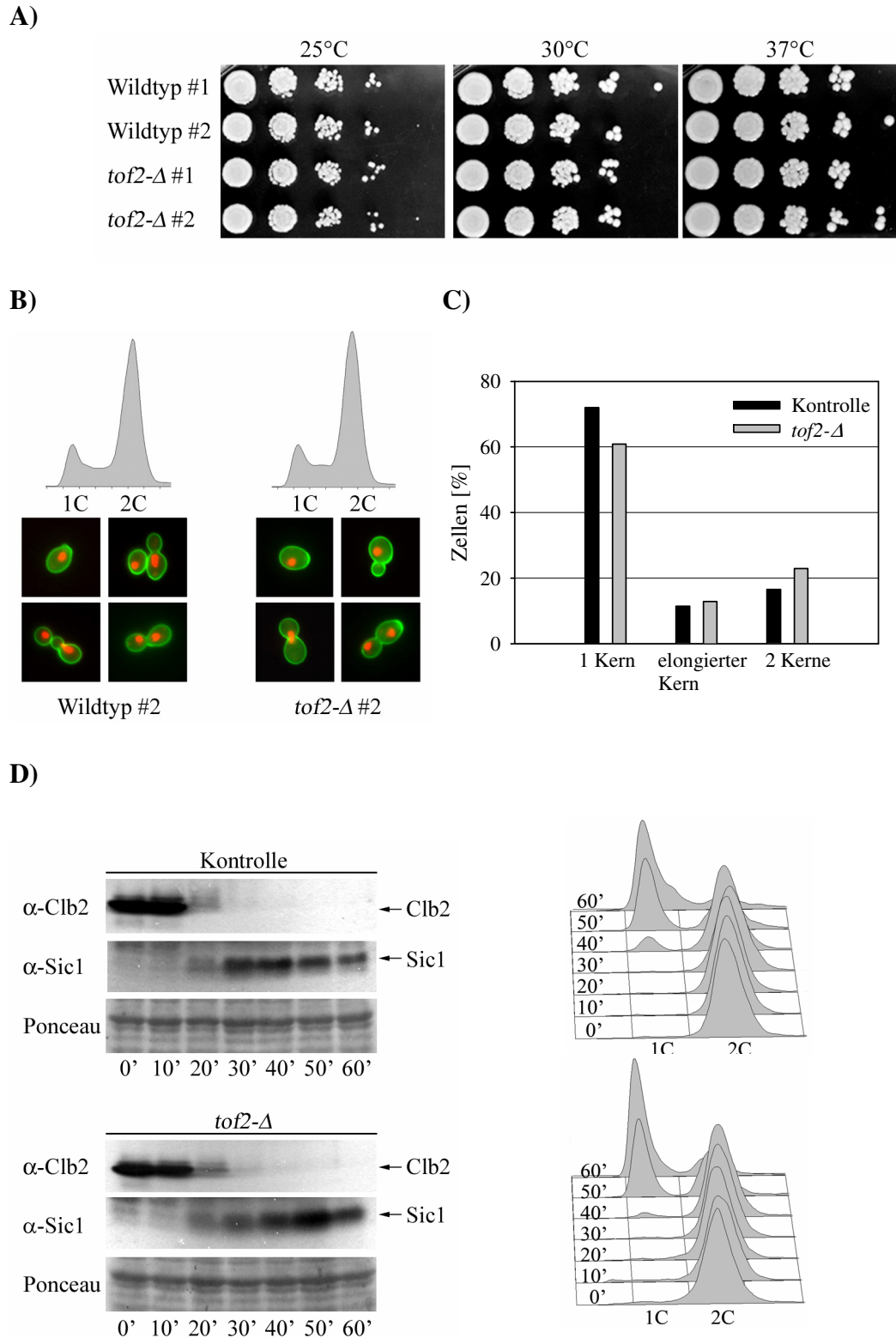


Abbildung 4.24: Analyse des Phänotyps von *tof2-Δ* Mutanten

A) Wachstumstest nach einer Deletion von *TOF2*. Die Stämme W4641 (*tof2-Δ::HIS3MX6 MATa* #1) und W4971 (*tof2-Δ::HIS3MX6 MATa* #2) wurden auf ihre Wachstumsfähigkeit getestet. Dazu wurden Verdünnungsreihen dieser Stämme in 1:10-er Schritten auf Vollmediumsplatten mit Glucose aufgebracht und 1-2 Tage bei 25°C, 30°C und 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurden die Stämme K699 (Wildtyp #1) und K700 (Wildtyp #2) eingesetzt. **B) & C) Analyse der *tof2*-Deletionsmutante in der Durchflußzytomterrie und**

mikroskopisch. Die Stämme W4971 (*tof2-Δ::HIS3MX6 MATα*) und K700 (WT) wurden in XY-D bei 25°C bis zur exponentiellen Wachstumsphase kultiviert und anschließend wurden Proben dieser Stämme ethanolfixiert, um diese für die Durchflußzytometrie und mikroskopische Analysen aufarbeiten zu können. Die Profile der Durchflußzytometrie zeigen den DNA-Gehalt (G1 = 1C; M-Phase = 2C). Für die mikroskopische Analyse wurde die Zellwand mit ConA-FITC angefärbt und die DNA mittels DAPI visualisiert. **D) Analyse des Austritts aus der Mitose der *tof2-Δ* Mutante.** Die Stämme W5567 (*NET1^{m9}-TRP1 cdc20-Δ::LEU2 ade2::pGALL-CDC20-tCYC1-ADE2*) und W5563 (*tof2-Δ::HIS3MX6 NET1^{m9}-TRP1 cdc20-Δ::LEU2 ade2::pGALL-CDC20-tCYC1-ADE2*) wurden in XY-Raf/Gal (je 2%) Medium bis zu der exponentiellen Wachstumsphase (0,4 OD) kultiviert, gewaschen und anschließend in XY-D Medium für 3 h inkubiert. Nach einem erneuten Waschvorgang wurden die Zellen in XY-Raf/Gal umgesetzt und für eine weitere Stunde bei 25°C kultiviert. Zu den in der Abbildung angegebenen Zeitpunkten wurden Proben genommen und für eine Western-Blot-Analyse aufgearbeitet und zusätzlich ethanolfixiert. Sic1 und Clb2 wurden in der Western-Blot-Analyse mittels proteinspezifischer Kaninchenantisera nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente die Ponceaufärbung. Die ethanolfixierten Zellen wurden für eine Durchflußzytometrie aufgearbeitet, um den DNA-Gehalt der Zellen visualisieren zu können (G1 = 1C; M-Phase = 2C).

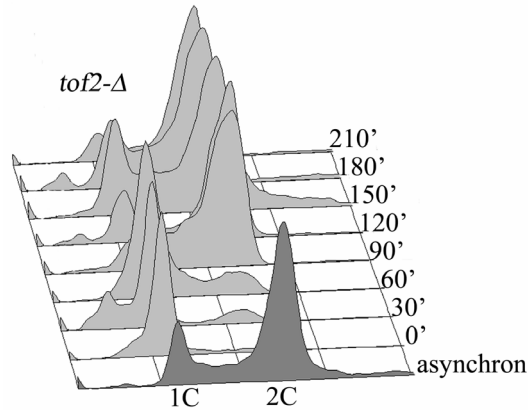
In Abbildung 4.24 D ist zu sehen, dass in *tof2-Δ* Mutanten sowohl die Clb2 Abnahme als auch die Sic1 Zunahme während der Anaphase größtenteils vergleichbar mit der Situation im Wildtypstamm ist. Die Profile der Durchflußzytometrie, die die Synchronizität der Zellen veranschaulichen, zeigen eine leicht verzögerte Zytokinese für die Deletionsmutante (Abbildung 4.24 D). Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass trotz marginaler Defekte der *tof2-Δ* Mutante, was den Verlauf später Mitoseereignisse betrifft, die Zellzyklusprogression weitestgehend normal ist und in ähnlicher Weise wie im Wildtypstamm abläuft.

4.5.4 Mikrotubulistrukturen in *tof2-Δ* Mutanten sind unverändert

Innerhalb der frühen Anaphase wird Cdc14 über das FEAR-Netzwerk freigesetzt. Die Aktivierung von FEAR und damit die Freisetzung der Phosphatase Cdc14 in dieser Phase des Zellteilungszyklus trägt durch die Lokalisierung des Ipl1-Sli15-Bir1 Komplexes am Mittelteil der Spindel zu deren Stabilisierung bei [Pereira & Schiebel 2003]. Aufgrund der Beobachtung anomaler Spindelstrukturen und kolabierter Spindeln in der *tof2*-Deletionsmutante mit ha4-Epitop markiertem *CDC14*, könnte man annehmen, dass Tof2 die Stimulierung der Cdc14-Funktion bei der Spindelstabilisierung unterstützt. Um dies zu untersuchen, wurden die Mikrotubulistrukturen in *tof2-Δ* Mutanten nochmals genauer analysiert, da die zerstörten Spindeln in den *tof2-Δ CDC14^{h4}* Mutanten nur in extrem großen Zellen beobachtet werden konnten, die schon lange ungünstigen Bedingungen ausgesetzt waren. Durch zentrifugale Elutriation wurde die *tof2-Δ CDC14^{h4}* Mutante synchronisiert. Eine Zellpopulation bestehend

aus kleinen Tochterzellen ohne Knospe konnten während des Vorgangs der Elutriation vom Rest der Kultur abgetrennt werden. Diese Population an G1 Zellen wurde in frischem Vollmedium angeimpft und über 3,5 h bei 25 °C kultiviert.

A)



B)

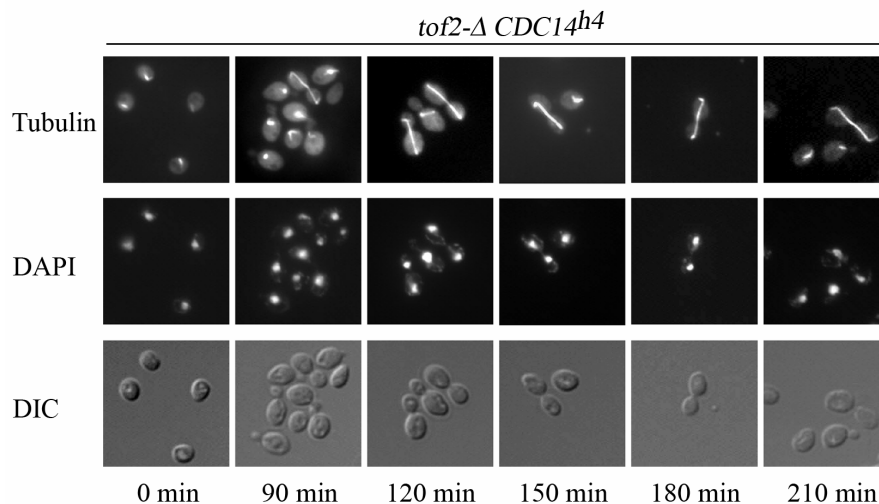


Abbildung 4.25: Spindelstrukturen in synchronen *tof2-Δ Cdc14^{h4}*-Mutanten

Der Stamm W5091 (*tof2-Δ::HIS3MX6 CDC14^{h4}-LEU2*) wurde in XY-D bei 25°C bis zur exponentiellen Wachstumsphase kultiviert und über zentrifugale Elutriation synchronisiert. Zu den in der Abbildung angegebenen Zeitpunkten wurden Proben der synchronisierten Zellen genommen und ethanol- bzw. formaldehydfixiert, um diese für die Durchflußzytometrie oder indirekte Immunfluoreszenz aufarbeiten zu können. **A) Durchflußzytometrische Analyse.** DNA-Gehalt des elutriierten Stamms W5091 (G1 = 1C; M-Phase = 2C). **B) Mikroskopische Analyse.** Indirekte Immunfluoreszenz mit YOL1/34 gegen Tubulin und anti-Ratte-Alexa546 diente als Sekundärantikörper. Die DNA wurde mit DAPI angefärbt. Außerdem ist in der Abbildung die Zellmorphologie (DIC) zu sehen. Die Analyse der Zellen erfolgte im Fluoreszenzmikroskop Axio Imager von Zeiss.

Zu den in der Abbildung 4.25 A angegebenen Zeitpunkten wurden Proben genommen und ethanol- bzw. formaldehydfixiert, um diese in der Durchflußzytometrie und indirekten Immunfluoreszenz analysieren zu können. Die Profile der Durchflußzytometrie zeigen, dass

durch die zentrifugale Elutriation eine synchrone Kultur in G1 erhalten wurde (1C DNA-Gehalt, 0 Minuten) mit der die Kultivierung bei 25°C startete. 90 Minuten nachdem die G1-Population in frischem Vollmedium angeimpft worden ist, weist der Großteil der Zellen replizierte DNA auf (2C DNA-Gehalt). Danach wird die Kultur wieder asynchron (Abbildung 4.25 A). In der indirekten Immunfluoreszenz wurden die Spindelstrukturen mit einem Antikörper gegen Tubulin in mehr als 200 Anaphase Zellen analysiert. Es waren jedoch keine kollabierten Spindeln oder anomale Strukturen zu detektieren (Abbildung 4.25 B).

4.5.5 Die Trennung des Nukleolus in *tof2-1* Mutanten ist verzögert

Hinweise, dass die Phosphatase Cdc14 eine Rolle bei der Trennung des Nukleolus zu haben scheint, gab bereits eine Publikation von Granot & Snyder 1991. Diese Beobachtung konnte durch neuere Studien weiter belegt werden [D'Amours *et al.* 2004, Sullivan *et al.* 2004, Machín *et al.* 2005]. Cdc14-abhängig wird Condensin an der rDNA lokalisiert, was zu deren Kompaktierung beiträgt, ohne die eine vollständige Trennung dieses extrem langen Gen Locus nicht möglich wäre. Da Tof2 ein nukleolares Protein ist, liegt nahe, dessen Beteiligung an der Trennung des Nukleolus zu untersuchen. Dazu wurde die Trennung von Net1 als ein etablierter nukleolarer Marker [Machín *et al.* 2005] in asynchronen und synchronen Kulturen der *tof2*-Deletionmutante mittels indirekten Immunfluoreszenz analysiert (Kapitel 4.5.5.1 und 4.5.5.2).

4.5.5.1 Analyse der Trennung des Nukleolus in asynchronen *tof2-1* Mutanten

Asynchron wachsende Zellpopulationen von diploiden Stämmen wurden formaldehydfixiert und für die indirekte Immunfluoreszenz aufgearbeitet. Der Experimentalstamm war homozygot für die *TOF2* Deletion und heterozygot für epitopmarkiertes *NET1*, während der Kontrollstamm homozygot für das Wildtyp Allel von *TOF2* war und heterozygot für epitopmarkiertes *NET1*. In der indirekten Immunfluoreszenz wurde die Net1 Trennung ausschließlich in Anaphase Zellen analysiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Die Weite ihrer Trennung war ein Maß für die Einteilung der Zellen in die frühe oder späte Anaphase.

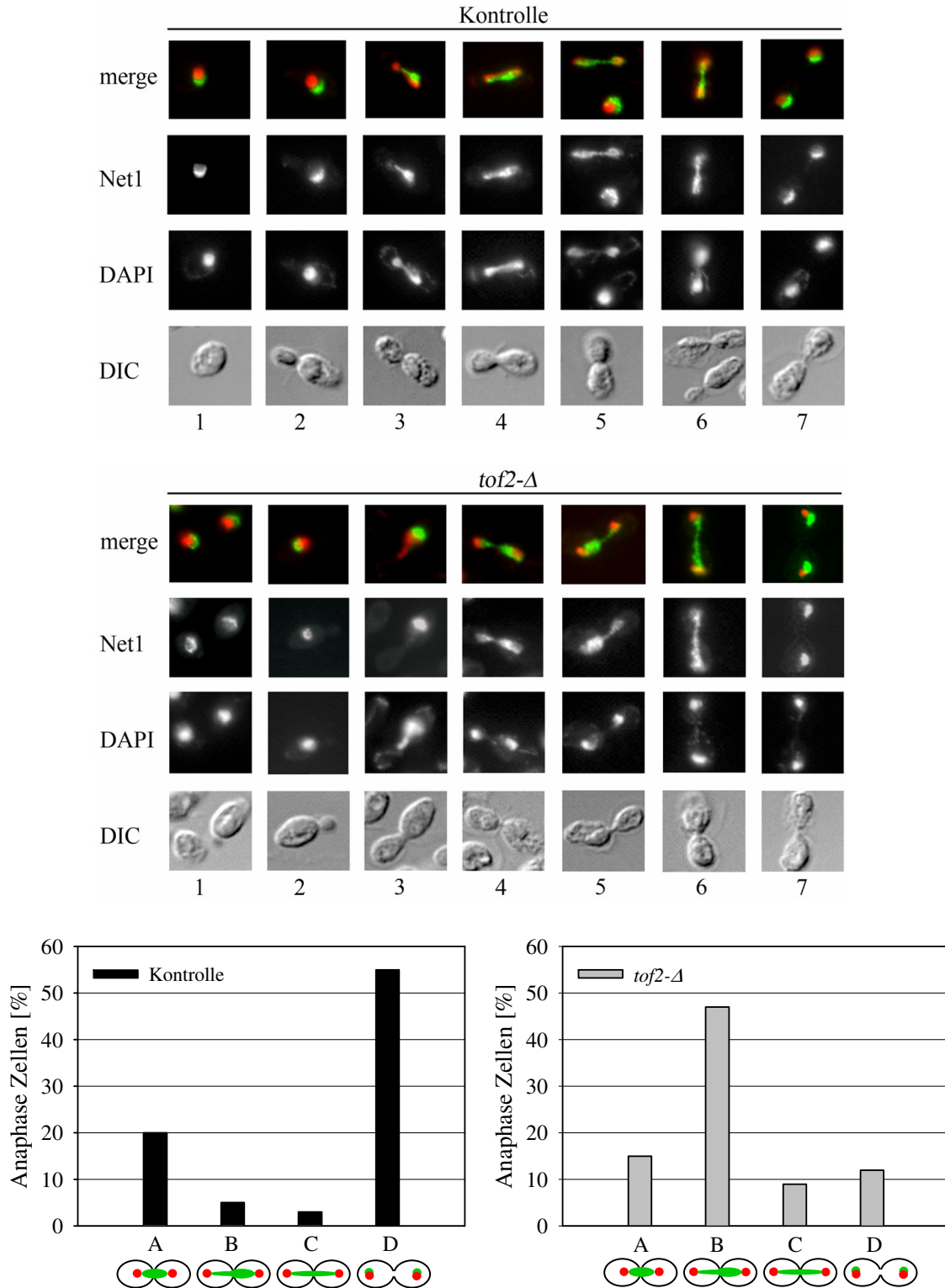


Abbildung 4.26: Trennung des Nukleolus in asynchronen *tof2-Δ* Mutanten

Die Stämme W5855 (*NET1^{m9}-TRP1/NET1*) und W5306 (*tof2-Δ::HIS3MX6/tof2-Δ::NATMX4 NET1^{m9}*

-TRP1/NET1) wurden in XY-D bei 25°C bis zur exponentiellen Wachstumsphase kultiviert. Asynchron wachsende Zellen wurden mit 4,5% Formaldehyd fixiert. Das myc-Epitop markierte Net1 wurde mittels des Maus-anti-myc Antikörpers 9E10 und des sekundären anti-Maus Alexa488 sichtbar gemacht. Die DNA wurde durch DAPI angefärbt. Abgebildet ist außerdem die Zellmorphologie (DIC) und eine Überlagerung der Net1 und DNA Signale (merge). Die Analyse der Net1 Trennung erfolgte im Fluoreszenzmikroskop Axio Imager von

Zeiss, es wurden über 200 Anaphase Zellen pro Stamm ausgezählt. Die Zahlen 1-7 stehen für unterschiedliche Phasen innerhalb der Zellteilung, während A-D die verschiedenen Klassen der Nukleolustrennung während der Anaphase kennzeichnen.

In Abbildung 4.26 sind die unterschiedlichen Phasen der Kern- und Nukleolustrennung dargestellt. Die Zahlen 1-7 stehen für die unterschiedlichen Stadien innerhalb der Zellteilung. Die Stadien 1 & 2 zeigen Zellen, deren Kernteilung noch nicht eingesetzt hat. In diesen Stadien zeigt die *tof2*-Deletionsmutante halbmondförmige Lokalisationsmuster für Net1 ähnlich der nukleolaren Lokalisation von Net1 im Kontrollstamm. In den Stadien 3-7 sind Zellen, die sich in der frühen bzw. späten Anaphase befinden, zu sehen. Die Trennung des Nukleolus setzt verglichen zur Trennung der Hauptmasse an DNA verzögert ein (Stadium 3 & 4). Innerhalb der frühen Anaphase ist noch kein Unterschied zwischen der Nukleolustrennung im Kontrollstamm und der Mutante zu sehen. Späte Anaphase Zellen der *tof2*-Deletionsmutante zeigen jedoch Sonderformen innerhalb der Trennung des Nukleolus (Stadium 5 & 6). Zellen mit der *TOF2* Deletion zeigen einen asymmetrisch verteilten oder nicht getrennten Nukleolus (nukleolare Brücke) zwischen den zwei weit getrennten Zellkernen. Wenn man diese Sonderformen quantifiziert, zeigt sich, dass über 50% der Zellen diese Defekte in der Nukleolustrennung aufweisen. Demgegenüber zeigen fast 50% des Kontrollstamms halbmondförmige nukleolare Strukturen, die sich an die bereits weit voneinander getrennten Kerne anheften (Stadium 7, Klasse D).

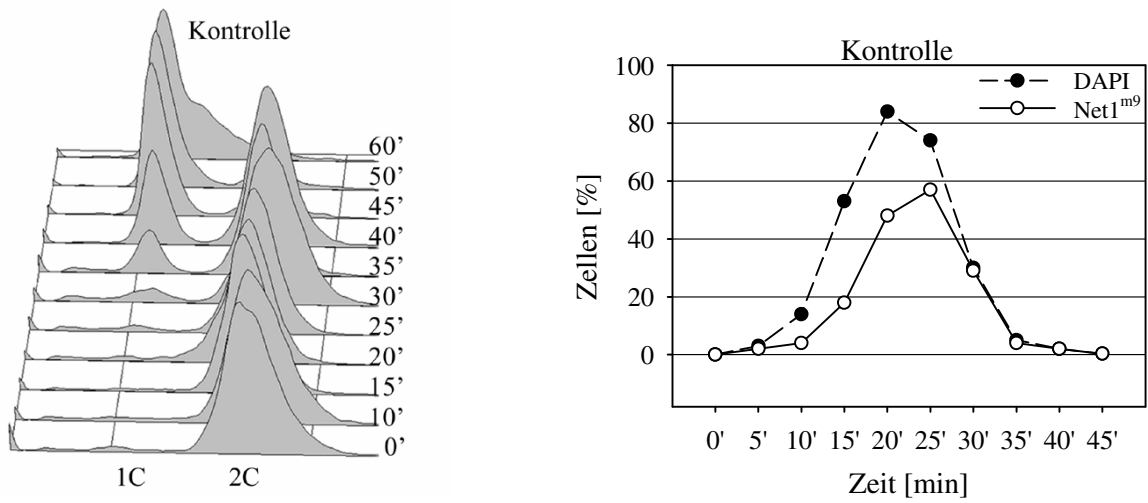
4.5.5.2 Analyse der Trennung des Nukleolus in synchronen *tof2-Δ* Mutanten

Aufgrund der Beobachtungen, dass die *tof2*-Deletionsmutante Probleme innerhalb der Nukleolustrennung aufweist und die Anaphase in dieser Mutante etwas verzögert ist, sollte die Trennung des Nukleolus in einer synchronen Kultur zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht werden, um eine Aussage über die zeitliche Abfolge der Nukleolustrennung machen zu können.

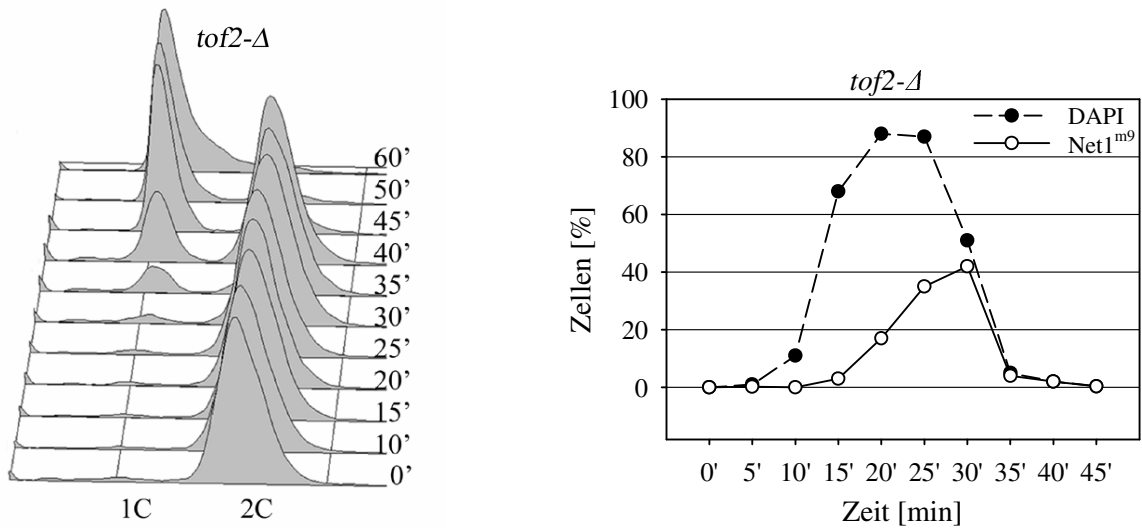
Ein Kontrollstamm und ein Experimentalstamm, die beide *NET1^{m9}* exprimierten, wobei der Experimentalstamm noch zusätzlich die *TOF2* Deletion enthielt, wurden durch reversible Deletion von *CDC20* synchronisiert [Shirayama *et al.* 1999] (Kapitel 7.2.2.2). Die Deletion von *CDC20* hat einen Arrest in der Metaphase zur Folge, während über die anschließende Rekonstitution des Gens ein synchroner Durchlauf der Anaphase möglich ist. Zu den in der Abbildung 4.27 angegebenen Zeitpunkten wurden Proben genommen, ethanol- bzw. formaldehydfixiert und für die Durchflußzytometrie und indirekte Immunfluoreszenz aufgearbeitet.

Die Profile der Durchflußzytometrie in Abbildung 4.27 A & B zeigen, dass der Arrest in der Metaphase erfolgreich war. Sowohl der Kontrollstamm als auch die *tof2*-Deletionsmutante zeigen nach dem Arrest einen 2C DNA-Gehalt, was ein Hinweis auf Zellen mit replizierter DNA ist. Circa 35 Minuten nach der Rekonstitution von *CDC20* treten die Zellen aus der Mitose aus und vollziehen Zytokinese. Neben Zellen mit replizierter DNA (2C DNA-Gehalt), können Zellen mit 1C DNA-Gehalt (G1-Zellen) detektiert werden. Das Erscheinen von G1-Zellen und somit die Zytokinese scheint in der *tof2*-Deletionsmutante etwas verzögert zu sein (Abbildung 4.27 B), was bereits in Kapitel 4.5.3 beobachtet werden konnte. Der quantitative Vergleich getrennter Nukleoli auf die Trennung der Zellkerne bezogen, zeigt, dass die Trennung des Zellkerns im Kontrollstamm und der Mutante mit einer ähnlichen Kinetik abläuft, während die nukleolare Trennung in der *tof2-1* Mutante 5-10 Minuten verzögert ist (Abbildung 4.27 A & B), was die Verzögerungen in der Anaphase/Telophase und der Zytokinese in diesen Mutanten erklären könnte.

A)



B)



C)

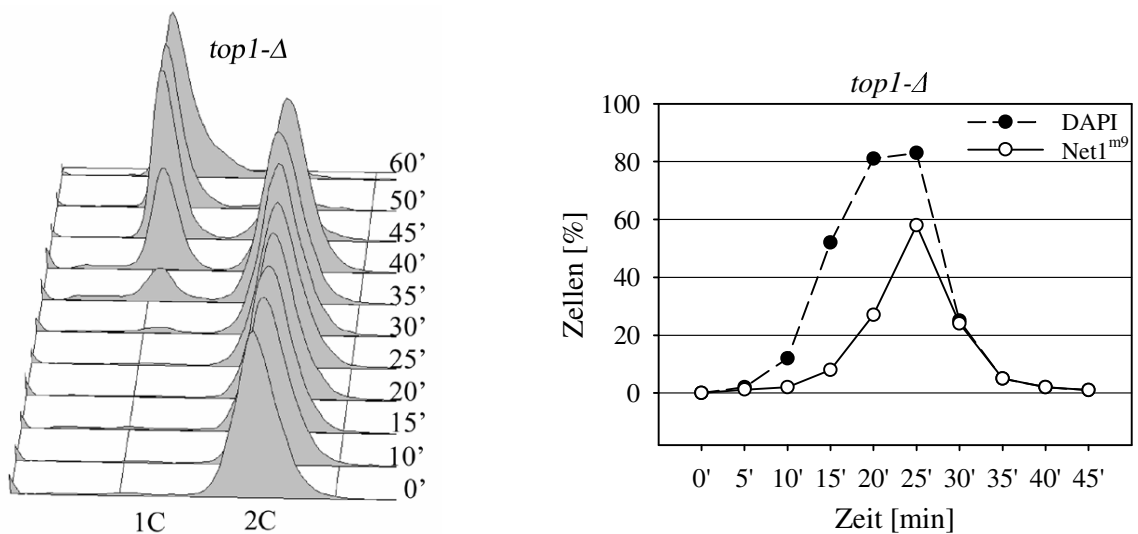


Abbildung 4.27: Trennung des Nukleolus in synchronen *tof2-Δ* und *top1-Δ* Mutanten

Abbildung 4.27: Trennung des Nukleolus in synchronen *tof2-Δ* und *top1-Δ* Mutanten

A) & B) & C) Mikroskopische Analyse der Nukleolustrennung in *tof2-Δ* und *top1-Δ* Mutanten. Die Stämme W5567 (*NET1^{mg}-TRP1 cdc20-Δ::LEU2 ade2::pGALL-CDC20-tCYC1-ADE2*), W5563 (*tof2-Δ::HIS3MX6 NET1^{mg}-TRP1 cdc20-Δ::LEU2 ade2::pGALL-CDC20-tCYC1-ADE2*) und W5820 (*top1-Δ::HIS3MX6 NET1^{mg}-TRP1 cdc20-Δ::LEU2 ade2::pGALL-CDC20-tCYC1-ADE2*) wurden in XY-Raf/Gal (je 2%) Medium bis zu der exponentiellen Wachstumsphase (0,4 OD) kultiviert, gewaschen und anschließend in XY-D Medium für 3h inkubiert. Nach einem erneuten Waschvorgang wurden die Zellen in XY-Raf/Gal umgesetzt und für eine weitere Stunde kultiviert. Zu den in der Abbildung angegebenen Zeitpunkten wurden Proben genommen, ethanol- und formaldehydfixiert und anschließend für eine Durchflußzytometrie (DNA-Gehalt; G1 = 1C; M-Phase = 2C) und indirekte Immunfluoreszenz aufgearbeitet. Das myc-Epitop markierte Net1 wurden mittels des Maus-anti-myc Antikörpers 9E10 und des sekundären anti-Maus Alexa488 sichtbar gemacht. Die DNA wurde durch DAPI angefärbt. Die Analyse der Net1 Trennung erfolgte im Fluoreszenzmikroskop Axio Imager von Zeiss, es wurden über 200 Anaphase Zellen pro Zeitpunkt für jeden Stamm ausgezählt.

4.5.6 Vergleich der Trennung des Nukleolus in *tof2-Δ* und *top1-Δ* Mutanten

Tof2 wurde ursprünglich als Topoisomerase I-Interaktionsfaktor in einer Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse identifiziert [Park & Sternglanz 1999]. Topoisomerasen sind Enzyme, die durch die Einführung von DNA-Einzel- (Typ 1) oder Doppelstrang-Brüchen (Typ 2) und Religation der DNA-Phosphodiester-Bindungen DNA Topoisomere entwinden. Aufgrund der Beteiligung der Topoisomerase I am DNA-Metabolismus, sollte geklärt werden, ob die verzögerte rDNA Trennung in *tof2*-Deletionsmutanten, auf die fehlende Interaktion mit der Topoisomerase I zurückzuführen ist.

Ein Stamm, der die *TOP1* Deletion trägt, eingeführt über PCR-vermittelte Gendeletion [Longtine *et al.* 1998], wurde, wie in Kapitel 4.5.5.2 beschrieben, synchronisiert. Zu den in der Abbildung 4.27 angegebenen Zeitpunkten wurden Proben genommen und mit Ethanol oder Formaldehyd fixiert. Die Proben wurden in der Durchflußzytometrie und innerhalb einer mikroskopischen Analyse vergleichend zu der *tof2*-Deletionsmutante und einem Kontrollstamm untersucht. Die Trennung des Nukleolus scheint in der *top1*-Deletionsmutante (Abbildung 4.27 C) im Vergleich zu dem Kontrollstamm (Abbildung 4.27 A) beeinflusst zu sein, jedoch nicht in dem Ausmaß wie es für die *tof2*-Deletionsmutante (Abbildung 4.27 B) beobachtet werden konnte. Außerdem ist in der Analyse der DNA-Profile in der Durchflußzytometrie zu erkennen, dass die Verzögerung der Zytokinese bei der *top1*-Deletionsmutante im Vergleich zur *tof2-Δ* Mutante etwas abgeschwächt zu sein scheint (Abbildung 4.27 B & C). Die Tetradenanalysen in Abbildung 4.28 einer Kreuzung aus *top1-Δ* mit einem epitopmarkierten *CDC14* Allel (*CDC14^{h10}*) bzw. mit einer *cdc14* Mutante (*cdc14-3*) zeigen, dass *top1-Δ CDC14^{h10}* bzw. *top1-Δ cdc14-3* Doppelmutanten im Gegensatz zu *tof2-*

$\Delta CDC14^{h10}$ bzw. $tof2-\Delta cdc14-3$ Doppelmutanten existieren. Die $top1-\Delta CDC14^{h10}$ bzw. $top1-\Delta cdc14-3$ Doppelmutanten weisen im Vergleich zu $top1-\Delta$ Einzelmутanten, die ein etwas verlangsamtes Wachstum zeigen, das sich jedoch in einem Wachstumstest nach 2 Tagen bei 30°C nicht mehr auswirkt (Daten nicht gezeigt), keine bzw. nur geringe synthetische Effekte auf, woraus zu schließen ist, dass die Defekte in der Nukleolustrennung der $top1$ -Deletionsmutante unabhängig sind von Cdc14.

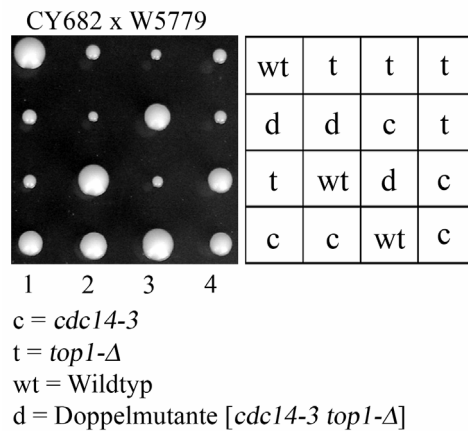
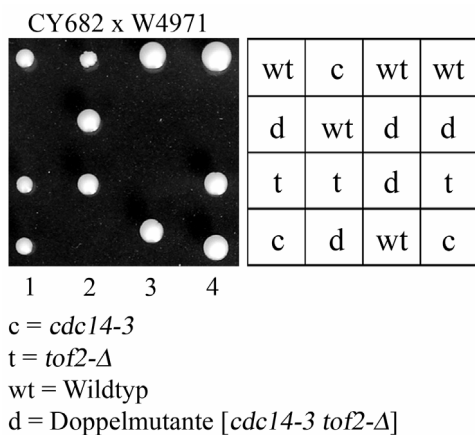
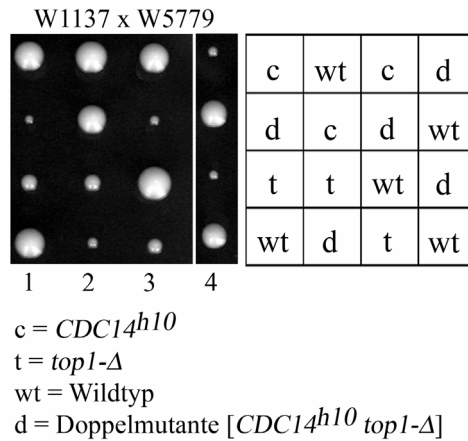
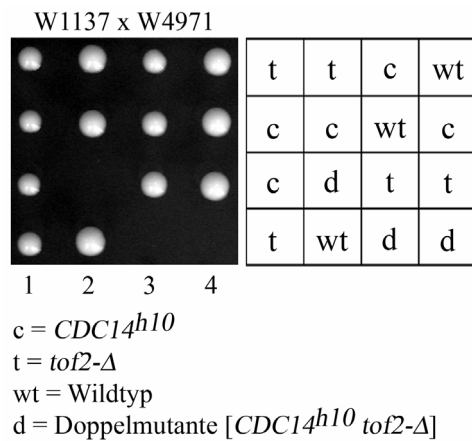


Abbildung 4.28: Genetische Interaktionen der $top1-\Delta$ Mutanten

Die Stämme W4971 ($tof2-\Delta::HIS3MX6$) und W1137 ($CDC14^{h10}-LEU2$), W4971 ($tof2-\Delta::HIS3MX6$) und CY682 ($cdc14-3$), W5779 ($top1-\Delta::HIS3MX6$) und W1137 ($CDC14^{h10}-LEU2$), sowie W5779 ($top1-\Delta::HIS3MX6$) und CY682 ($cdc14-3$) wurden gekreuzt und anschließend zur Sporulation gebracht. Nach der Trennung der Sporen auf Vollmediumsplatten mit Glucose wurden diese bei 25°C für 4 Tage inkubiert. Es wurden für jede Kreuzung jeweils 12 Tetraden analysiert.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die $tof2-\Delta cdc14-3$ Doppelmutante durch die Deletion des chromosomalen rDNA Locus gerettet werden kann (persönliche Mitteilung von Michael Schwab), was das Zusammenspiel von Tof2 und Cdc14 bei der Kompaktierung und Trennung

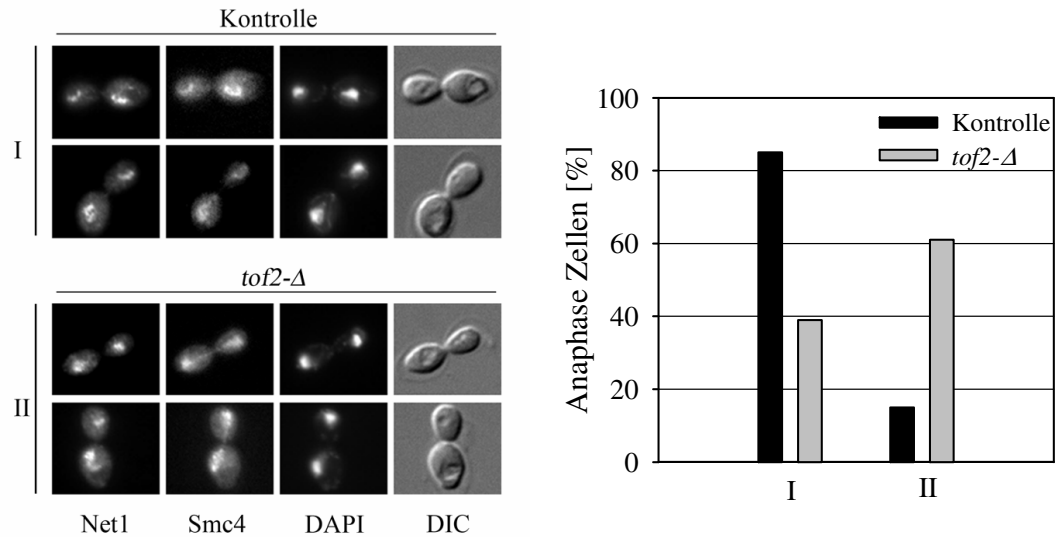
der rDNA noch zusätzlich unterstreicht und die Unabhängigkeit dieses Ereignisses von Top1 zeigt.

4.5.7 Condensin ist partiell delokalisiert während der Anaphase in *tof2-Δ* Mutanten

Es konnte gezeigt werden, dass der heteropentamere Condensin-Komplex während der Anaphase in Abhängigkeit von Cdc14 sein Lokalisationsmuster ändert [D'Amours *et al.* 2004, Sullivan *et al.* 2004]. Condensin lokalisiert in der Anaphase im Nukleolus, während es über den Rest des Zellteilungszyklus im Zellkern zu detektieren ist. Eine Publikation von Wang *et al.* 2004 wies darauf hin, dass in *cdc14* Mutanten, die bei restriktiver Temperatur mit einem ungetrennten Nukleolus in der Anaphase arretieren, die Condensin Untereinheit Smc4 keine nukleolare Lokalisation zeigt.

Um die Condensinlokalisierung in *tof2*-Deletionsmutanten zu untersuchen, wurde ein diploider Experimentalstamm hergestellt, der heterozygot für ha3-Epitop markiertes *NET1* und myc13-Epitop markiertes *SMC4* war und homozygot für die Deletion von *TOF2*. Der entsprechende Kontrollstamm war heterozygot diploid für die erwähnten Merkmale. Asynchrone Kulturen dieser Stämme wurden für eine indirekte Immunfluoreszenz aufgearbeitet. Net1 wurde als Nukleolusmarker herangezogen, während die DNA über DAPI sichtbar gemacht worden ist. Für eine quantitative Bestimmung der Condensinlokalisierung in Anaphase Zellen wurden über 200 Zellen analysiert.

Abbildung 4.29 zeigt, dass bei über 60% der *tof2-Δ* Mutante die Condensinuntereinheit Smc4 während der Anaphase nicht nur auf den Nukleolus beschränkt ist, sondern auch im Zellkern oder Nukleoplasma lokalisiert im Vergleich zu 15% im Kontrollstamm. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Tof2 bei der Anaphase-spezifischen Relokalisation von Condensin an die rDNA eine Rolle spielt, was eine korrekte Trennung der rDNA bedingt.



I: Lokalisation von Smc4 im Nukleolus während der Anaphase

II: Lokalisation von Smc4 im Zellkern oder Nukleoplasma während der Anaphase

Abbildung 4.29: Lokalisation von Smc4 in *tof2-Δ* Mutanten

Die Stämme W6679 (*SMC4^{m13}-kanMX6/SMC4 NET1^{h3}-kanMX6/NET1 tof2-Δ::HIS3MX6/TOF2*) und W6680 (*SMC4^{m13}-kanMX6/SMC4 NET1^{h3}-kanMX6/NET1 tof2-Δ::HIS3MX6/tof2-Δ::NATMX4*) wurden in XY-D bei 25°C bis zur exponentiellen Wachstumsphase kultiviert. Asynchron wachsende Zellen wurden mit 4,5% Formaldehyd fixiert. Das myc-Epitop markierte Smc4 wurde mittels des Kaninchen-anti-myc Antikörpers A14 und des sekundären anti-Kaninchen Alexa546 sichtbar gemacht. Das ha-Epitop markierte Net1 wurde mittels des anti-ha Antikörpers 12CA5 und des sekundären anti-Maus Alexa488 visualisiert. Die DNA wurde durch DAPI angefärbt. Zudem ist noch die Zellmorphologie (DIC) gezeigt. Die Analyse der Smc4 und Net1 Lokalisation erfolgte im Fluoreszenzmikroskop Axio Imager von Zeiss, es wurden über 200 Anaphase Zellen pro Stamm ausgezählt.

5. DISKUSSION

Die Phosphatase Cdc14 ist ein multi-funktioneller Regulator mitotischer Ereignisse in *S. cerevisiae*. Cdc14 ermöglicht den Zellen einen Austritt aus der Mitose, indem es zur Inhibition der zyklinabhängigen Kinase Cdc28 und dem Abbau mitotischer Zykline in der Anaphase beiträgt. Weiterhin werden durch die Phosphatase Aktivität von Cdc14 Phosphorylierungsereignisse der zyklinabhängigen Kinase am Ende der Mitose umgekehrt. Somit stellt Cdc14 einen wichtigen Gegenspieler von Cdc28 dar. Darüber hinaus vermittelt Cdc14 die Positionierung und Stabilisierung der Spindel [Pereira & Schiebel 2003, Khmelinskii *et al.* 2007], die Trennung der rDNA [D'Amours *et al.* 2004, Sullivan *et al.* 2004, Higuchi & Uhlmann 2005] und die Einleitung der Zytokinese. Vor allem die Trennung des hochrepetitiven rDNA Locus rückte in den vergangenen Jahren in den Focus des Interesses. Die physikalische Länge und die hohe Transkriptionsrate dieses Locus durch die RNA Polymerase I erfordert spezialisierte Cdc14-abhängige Trennungsmechanismen. Im Gegensatz zum Rest des Genoms ist die Spaltung der Cohesin Untereinheit Scc1 nicht hinreichend für eine Trennung des rDNA Locus [Sullivan *et al.* 2004]. Eine zusätzliche Cohesin-unabhängige Kohäsion, die wohl das Resultat der starken Transkription des rDNA Locus ist [Machín *et al.* 2006, Tomson *et al.* 2006], muss gelöst werden. Um die Kompaktierung und Trennung dieses hochrepetitiven DNA Locus zu gewährleisten, trägt Cdc14 zu einer Anaphase-spezifischen Relokalisation des heteropentameren Condensin-Komplexes an die rDNA bei [D'Amours *et al.* 2004, Wang *et al.* 2004]. Innerhalb dieser Arbeit konnte das im Nukleolus lokalisierte Protein Tof2 als eine neue Komponente der Cdc14-abhängigen rDNA Trennung identifiziert werden. Tof2 ist mit Cdc14 und Net1 Teil des nukleolaren RENT-Komplexes und am regionspezifischen rDNA-silencing beteiligt [Huang *et al.* 2006]. Es konnte im Verlauf dieser Arbeit gezeigt werden, dass der N-terminale Teil von Tof2, der eine 30%-ige Sequenzidentität zu der Cdc14-Bindungsdomäne von Net1 aufweist, direkt mit der Phosphatase Cdc14 interagiert. Im Unterschied zu Net1 ist Tof2 jedoch kein Inhibitor der Phosphatase sondern unterstützt deren Aktivität *in vitro* und *in vivo*. *tof2*-Deletionsmutanten zeigen eine verzögerte Trennung des nukleolaren Markers Net1 mit einem marginalen Effekt auf den Verlauf der Anaphase/Telophase bzw. Zytokinese. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die *tof2*-Deletionsmutanten Defekte in der Relokalisation der Condensinuntereinheit Smc4 in den Nukleolus während der Anaphase aufweisen. Aus diesen Beobachtungen ist zu schließen, dass Tof2 Cdc14 bei der Trennung

der rDNA unterstützt, indem die Lokalisation von Condensin an diesen Gen Locus erleichtert wird, wobei die genauen molekularen Mechanismen noch unbekannt sind.

5.1 Tof2 interagiert mit Cdc14 *in vitro* und formt mit der Phosphatase und Net1 einen gemeinsamen Komplex *in vivo*

Für eine korrekt ablaufende Anaphase und den Austritt der Zelle aus der Mitose ist die Phosphatase Cdc14 unabdingbar [D'Amours & Amon 2004, Stegmeier & Amon 2004]. Um Fehler zu vermeiden, wird die Phosphatase Aktivität durch den Inhibitor Net1 streng reguliert. Aufgrund der Sequenzähnlichkeiten der N-terminalen Teile von Tof2 und Net1 (Abbildung 3.6) und des vergleichbaren nukleolaren Lokalisationsmusters dieser beiden Proteine während des Zellteilungszyklus (Abbildung 4.1) lag nahe, eine mögliche Verbindung von Tof2 zu der Phosphatase Cdc14 zu untersuchen. Im Hinblick auf die unterschiedlichen Mengenverhältnisse von Cdc14 zu seinem Inhibitor Net1, in der Zelle liegt ungefähr fünfmal soviel Cdc14 wie Net1 vor (Abbildung 4.11) [Ghaemmaghami *et al.* 2003], sollte die Frage geklärt werden, ob Tof2 einen zu Net1 alternativen Verankerungs- und Regulationsmechanismus für Cdc14 darstellen könnte.

Coimmunpräzipitationen konnten zeigen, dass Tof2 mit Cdc14 und Net1 *in vivo* assoziiert ist (Abbildung 4.2, Abbildung 4.8), was darauf hinweist, dass diese Proteine in einem größeren Komplex im Nukleolus vorliegen. Dieses Ergebnis bestätigt jüngste Daten von Huang *et al.* 2006. Dagegen ist in einer *net1*-Deletionsmutante keine Interaktion von Tof2 und Cdc14 zu detektieren (Abbildung 4.9), jedoch ist durch das Fehlen von Net1, einer wichtigen Strukturkomponente des Nukleolus, die nukleolare Integrität völlig aufgehoben [Shou *et al.* 2001]. Mikroskopische Analysen machten deutlich, dass sowohl Tof2 als auch Cdc14 in der *net1*-Deletionsmutante nicht mehr im Nukleolus lokalisiert sind (Abbildung 4.13, Abbildung 4.14 B). Eine Interaktion dieser beiden Proteine außerhalb des Nukleolus scheint also nicht stattzufinden. Diese Beobachtung könnte Affinitätsgründe haben. Es wäre denkbar, dass nur aufgrund der räumlichen Nähe im Nukleolus eine Interaktion von Tof2 und Cdc14 ermöglicht wird, die nicht mehr stattfinden kann, sobald sich die Proteine auf den gesamten Zellkern verteilen. Weiterhin könnte eine Modifikation von Tof2 oder Cdc14 oder beider Proteine, die nur innerhalb des nukleolaren Umfelds erfolgen kann, für eine Assoziation notwendig sein. Von Cdc14 ist bereits bekannt, dass es *in vivo* phosphoryliert wird [Visintin *et al.* 2003], wobei die Relevanz dieser Modifikation noch nicht geklärt ist.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der N-terminale Bereich von Tof2 notwendig und hinreichend ist für eine Interaktion mit der Phosphatase. In einer Publikation von Traverso *et al.* 2001 wurde eine Interaktion von Tof2 mit Cdc14 ausgeschlossen, da eine C-terminale Verkürzung von Net1, die ausschließlich den zu Tof2 ähnlichen Bereich umfasst, nicht mehr mit der Phosphatase interagieren kann. Analog zu dieser Veröffentlichung wurden C-terminale Verkürzungen von Tof2 hergestellt, die die ersten 600, 341 und 233 Aminosäuren aufweisen, wobei das kürzeste Tof2 Derivat ausschließlich den N-terminalen Bereich umfasst, der die 30%-ige Sequenzidentität zu dem N-terminalen Bereich von Net1 besitzt. Coimmunpräzipitationen ließen erkennen, dass die C-terminalen Verkürzungen von Tof2 mit Cdc14 *in vivo* einen gemeinsamen Komplex bilden (Abbildung 4.3 A). Auch die größte C-terminale Verkürzung von Tof2 zeigte eine Interaktion mit Cdc14, wenn auch etwas abgeschwächt im Vergleich zu dem unverkürzten Protein und den anderen Tof2 Derivaten. Im Gegensatz dazu war die Interaktion der N-terminalen Verkürzungen von Tof2 mit Cdc14 *in vivo* aufgehoben (Abbildung 4.3 B). Sowohl Net1 als auch Tof2 besitzen ähnliche Cdc14 Interaktionsdomänen innerhalb ihrer sequenzähnlichen N-terminalen Bereiche, obwohl die Bindungsspezifität dieser beiden Proteine für die Phosphatase eine wenig unterschiedlich zu sein scheint (Abbildung 4.5). Die *in vivo* Ergebnisse wurden noch zusätzlich durch eine *in vitro* Interaktionsanalyse bestätigt (Abbildung 4.10). Die Interaktion des N-terminalen Teils von Tof2 mit Cdc14 ist also kein indirektes Ereignis sondern von direkter Natur wie dies auch für den N-terminalen Teil von Net1 gezeigt werden konnte [Traverso *et al.* 2001].

Lokalisationsstudien der C- und N-terminal verkürzten Tof2 Derivate zeigten, dass sowohl die beiden C-terminalen Verkürzungen, die die ersten 341 und 233 Aminosäuren umfassen, als auch die N-terminalen Tof2 Verkürzungen partiell delokalisiert sind (Abbildung 4.4 A). Neben der Lokalisation im Nukleolus sind sie zu einem großen Teil im Zellkern lokalisiert. Cdc14 ist in diesen Stämmen im Nukleolus zu detektieren, außer in dem Stamm, der die größte C-terminale Verkürzung von *TOF2* (*TOF2^{m13} 1-233*) exprimiert (Abbildung 4.4 B). Dieser Stamm ist darüber hinaus in seinem Wachstum beeinträchtigt, aber nur dann, wenn er zusätzlich ein epitopmarkiertes Allel von *CDC14* trägt. Die Delokalisation von Cdc14 durch die Expression von *TOF2^{m13} 1-233* könnte die Folge einer Beeinträchtigung der nukleolaren Integrität durch die extreme Verkürzung von Tof2 sein. Da Tof2 nicht nur mit Cdc14 interagiert sondern auch mit Net1, wäre vorstellbar, dass Tof2 ebenso wie Net1 einen Einfluss auf die Struktur des Nukleolus haben könnte. Um die Ursache der Delokalisation von Cdc14 in diesem Stamm zu klären, könnte zunächst einmal die nukleolare Struktur über einen bereits etablierten Marker wie Net1 [Machín *et al.* 2005] analysiert werden. Eine Freisetzung von

Cdc14 aus dem Nukleolus exklusiv durch die Delokalisation des Tof2 Derivats, Tof2^{m13} 1-233, ist an dieser Stelle eher auszuschließen, da sowohl das delokalisierte Tof2^{m13} 1-341 als auch die N-terminalen Verkürzungen von Tof2 zu keiner anomalen Lokalisation der Phosphatase beitragen. Alles in allem zeigten die Lokalisationsstudien der verkürzten Tof2 Derivate, dass multiple Bereiche von Tof2 für eine Verankerung im Nukleolus notwendig sind und Tof2 mit Net1 an der Architektur der nukleolaren Beschaffenheit beteiligt sein könnte, da angenommen wird, dass Tof2^{m13} 1-233 einen Zerfall des Nukleolus zur Folge hat, was bereits für eine artifiziell hohe Expression von *TOF2* beobachtet werden konnte (Kapitel 5.2).

Weitere Interaktionsanalysen von Tof2 und Cdc14 machten deutlich, dass die Bindung dieser beiden Proteine in ähnlicher Weise zu der Net1-Cdc14 Assoziation sowohl innerhalb der S- also auch innerhalb der Metaphase bestehen bleibt (Abbildung 4.6), aber während der Anaphase abnimmt (Abbildung 4.7), was für eine Freisetzung der Phosphatase Cdc14 von Tof2 während dieser Phase sprechen würde ähnlich wie es für Net1 gezeigt werden konnte [Shou *et al.* 1999, Visintin *et al.* 1999]. Demgegenüber zeigten mikroskopische Analysen der Cdc14 Lokalisation in *tof2*-Deletionsmutanten, dass Cdc14 bis zur Metaphase im Nukleolus lokalisiert und im Verlauf der Anaphase in den Zellkern und das Zytoplasma freigesetzt wird (Abbildung 4.12 A & B), was dem normalen Lokalisationsmuster von Cdc14 entspricht. Dies wiederum eröffnet die Frage, ob Tof2 tatsächlich in ähnlicher Weise wie Net1 ein permanenter nukleolarer Anker der Phosphatase Cdc14 darstellt und somit an deren Freisetzung beteiligt ist, da man bei der Deletion eines wichtigen inhibitorischen Verankerungsmechanismus für Cdc14 eine Delokalisation bzw. eine frühzeitige Freisetzung der Phosphatase erwarten würde, wenn auch nur partiell, da Net1 immer noch im Nukleolus lokalisiert und in der Lage ist mit Cdc14 zu interagieren. Außerdem müssen die Ergebnisse der Coimmunpräzipitationen mit dem Wissen betrachtet werden, dass Tof2, Cdc14 und Net1 einen gemeinsamen Komplex bilden und somit in den Copräzipitaten nie ausschließlich Cdc14 zu detektieren ist, das nur mit einem der beiden Proteine interagiert. Auch die Tatsache, dass delokalisierte Derivate von Tof2 nicht zu einer Fehllokalisierung der Phosphatase Cdc14 führen, außer, wenn noch andere Auswirkungen auf die Zelle zu berücksichtigen sind wie im Fall von Tof2^{m13} 1-233, spricht dafür, dass Tof2 keine oder nur eine untergeordnete Rolle bei der Freisetzung von Cdc14 spielt.

Analysen der Lokalisation von Tof2 und Cdc14 in *net1*-Deletionsmutanten, deren starke Wachstumsdefekte durch die zusätzliche Expression von *RRN3*, das für einen Transkriptionsaktivator der RNA Polymerase I codiert, gemindert wurden [Shou *et al.* 2001],

ließen leider keine weitere Aussage über die Verankerung und Freisetzung von Cdc14 über Tof2 zu, da trotz des zusätzlich exprimierten *RRN3* die beiden Proteine Tof2 und Cdc14 nicht im Nukleolus zu lokalisieren waren (Abbildung 4.14).

Die Generation N-terminaler Net1 Derivate trug auch nicht zur Lösung dieses Problems bei, da dieser Bereich von Net1 nicht nur zur Bindung und Inhibition von Cdc14 benötigt wird, sondern auch notwendig ist für die nukleolare Verankerung des Proteins selbst (Abbildung 4.15) [Stegmeier *et al.* 2004].

Alles in allem konnten durch die Interaktionsanalysen von Tof2 und Cdc14 gezeigt werden, dass die beiden Proteine direkt miteinander interagieren vergleichbar zu der Interaktion von Net1 mit Cdc14. Auch *in vivo* war ein vergleichbares Assoziationsmuster zu detektieren. Darüber hinaus weisen die erhaltenen Daten darauf hin, dass die Interaktion von Tof2 mit Cdc14 womöglich durch das nukleolare Umfeld etabliert wird. Die Ergebnisse der Lokalisationsstudien schließen Tof2 als einen alternativen inhibitorischen Anker für die Phosphatase Cdc14, der an deren Freisetzung beteiligt ist, eher aus. Bei den Lokalisationsanalysen von Cdc14 kam neben der Verwendung eines epitopmarkierten *CDC14* Allels auch ein Cdc14 Antiserum (Santa Cruz Biotechnology) erfolgreich zum Einsatz. Aufgrund der mangelnden Antikörperzugänglichkeit kompakter Strukturen nach langen Fixierungszeiten ist bei der Anwendung des Cdc14 Antiserums eine äußerst kurze Fixierung mit Formaldehyd (2 Minuten) zu beachten. Bei der Detektion epitopmarkierter *CDC14* Allele stellen längere Fixierungszeiten kein Problem für die Antikörperzugänglichkeit dar. Dies kann wahrscheinlich auf das vorhandene Epitop zurückgeführt werden, das trotz einer erhöhten Quervernetzung der nukleolaren Proteine gut für den epitopsepezifischen Antikörper zugänglich ist.

5.2 Tof2 stimuliert die Cdc14 Aktivität *in vitro* und *in vivo*

Untersuchungen der Funktionsähnlichkeiten von Tof2 und Net1 brachten detaillierte Einblicke in die Wirkungsweise von Tof2. Eine Messung der Phosphatase Aktivität *in vitro* [Taylor *et al.* 1997] zeigte, dass Net1 die Aktivität von Cdc14 inhibiert (Abbildung 4.18 A) in Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten [Shou *et al.* 1999, Visintin *et al.* 1999, Traverso *et al.* 2001]. Im Gegensatz dazu wurde die Cdc14 Aktivität durch die Zugabe des N-terminalen Bereichs von Tof2 nicht inhibiert sondern stimuliert (Abbildung 4.18 B). Auch das unverkürzte Tof2 hatte einen positiven Effekt auf die Cdc14 Aktivität *in vitro* (Daten nicht gezeigt).

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass sich Tof2 sogar *in vivo* nicht wie ein Inhibitor der Phosphatase verhält. Dazu wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt, die spezifisch auf die inhibitorische Funktion von Net1 auf Cdc14 hinweisen und Net1 als ein Zielprotein des MEN charakterisieren.

Net1 wurde ursprünglich identifiziert durch die Fähigkeit seiner Deletionsmutante die Temperatursensitivität und den Anaphase/Telophase Arrest einer *cdc15-2* Mutante, die zu keiner vollständigen Aktivierung von Cdc14 fähig ist, zu supprimieren [Shou *et al.* 1999]. Cdc15 ist eine Kinase des MEN und aktiviert über Phosphorylierung den Dbf2-Mob1 Komplex, der wiederum zur Freisetzung von Cdc14 aus dem Nukleolus beiträgt. Da es sich bei dem *cdc15-2* Allel um ein temperatursensitives Allel handelt, wirkt sich die Mutation erst bei höheren Temperaturen aus. Phänotypisch können die *cdc15-2* Mutanten durch die Ausbildung einer großen Knospe und bereits getrennten Chromosomen charakterisiert werden. *net1*-Deletionsmutanten können den Phänotyp einer *cdc15-2* Mutante unterdrücken, da in diesen Zellen Cdc14 nicht mehr im Nukleolus lokalisiert ist und damit nicht mehr inhibiert wird. Auf diese Weise kann ohne die Aktivierung der MEN Signalkaskade der Austritt aus der Mitose initiiert werden. Ein Wachstumstest zeigte, dass im Unterschied zu der *net1-Δ cdc15-2* Doppelmutante, die *tof2-Δ cdc15-2* Doppelmutante bei höheren Temperaturen (34°C und 37°C) nicht fähig war zu wachsen und sich wie die *cdc15-2* Einzelmutante verhielt (Abbildung 4.19). Einer *tof2*-Deletionsmutante ist es also nicht möglich im Gegensatz zu einer *net1*-Deletionsmutante, den Phänotyp einer *cdc15-2* Mutante zu unterdrücken, was eine inhibitorische Wirkung von Tof2 auf Cdc14 ausschließt. Außerdem macht dieses Ergebnis deutlich, dass Tof2 als eine Komponente des MEN, die unterhalb von Cdc15 wirken könnte, nicht in Frage kommt.

Weiterhin ist publiziert, dass hohe Mengen an Net1 die Cdc14 Aktivität beeinträchtigen und somit auch die von der Phosphatase ausgeführten Funktionen, was zu einer Lebensunfähigkeit der Zellen führt, da diese permanent in der späten Anaphase/frühen Telophase arretieren [Visintin *et al.* 1999]. Innerhalb dieser Arbeit wurden *TOF2* und *NET1* unter ähnlichen Bedingungen überexprimiert und die Auswirkungen auf die Hefezellen in einem Wachstumstest, mikroskopisch und in einer Durchflußzytometrie analysiert (Abbildung 4.20). Im Unterschied zur Überexpression von *NET1* hat die Überexpression von *TOF2* nur geringe Auswirkungen auf die Wachstumsfähigkeit der Hefezellen und das auch nur, wenn besonders große Mengen an *TOF2* exprimiert werden (Abbildung 4.20 A). Außerdem resultiert aus der Überexpression von *TOF2* kein Arrest in der Anaphase/Telophase (Abbildung 4.20 B & C), was auf eine Inhibition der Phosphatase Cdc14 hindeuten würde. Im Gegensatz dazu

supprimiert die Überexpression hoher Mengen von *TOF2* den Arrest Phänotyp einer *cdc15-2* Mutante (persönliche Mitteilung Michael Schwab), was auf eine *in vivo* Aktivierung von Cdc14 durch Tof2 hinweist. Unter den Überexpressionsbedingungen lokalisieren sowohl Tof2 als auch Cdc14 nicht mehr ausschließlich im Nukleolus sondern partiell auch im Zellkern (Abbildung 4.21 A), was die Suppression der *cdc15-2* Mutante durch die Überexpression von *TOF2* teilweise erklärt. Jedoch wird die Delokalisation von Cdc14 nicht nur durch die Fehllokalisierung von Tof2 bedingt, sondern durch die Auswirkungen auf den Nukleolus, die eine Überexpression von *TOF2* mit sich bringt. Diese bewirkt neben einer Fehllokalisierung von Cdc14 auch eine Delokalisation von Net1 (Abbildung 4.21 B), was die Beobachtung erklären könnte, dass nur extrem hohe Mengen an Tof2 zu einer *cdc15-2* Suppression fähig sind, da diese benötigt werden, um der inhibitorischen Wirkung von Net1 auf Cdc14 entgegenzuwirken. Zum einen liegt zwei- bis dreimal so viel Net1 wie Tof2 in der Zelle vor (Abbildung 4.11) und zum anderen ist die Affinität von Net1 zu der Phosphatase größer als die von Tof2 (Abbildung 4.18 C).

Um mehr über die Verbindung von Tof2 und Cdc14 *in vivo* zu lernen, wurde die Konsequenz der Kombination einer *TOF2* Deletion mit einem beeinträchtigten Allel von *CDC14* (*cdc14-3*) analysiert. Eine Tetradenanalyse des heterozygot diploiden Stamms *tof2-Δ/TOF2 cdc14-3/CDC14* zeigte, dass keine der erwarteten *tof2-Δ cdc14-3* Doppelmutanten fähig waren, sichtbare Kolonien zu formen (Abbildung 4.22), was die Beobachtung manifestiert, dass Tof2 nicht nur *in vitro* sondern auch *in vivo* die biologische Funktion von Cdc14 unterstützt im Unterschied zu Net1. Auch in diesem Punkt zeigte sich eine Diskrepanz des Verhaltens der *TOF2* Deletion zu dem Verhalten der Deletion von *NET1*. Im Gegensatz zu den *tof2-Δ cdc14-3* Doppelmutanten sind die *net1-Δ cdc14-3* Doppelmutanten lebensfähig [Tomson *et al.* 2006], was die Funktionsunterschiede dieser beiden Proteine noch zusätzlich hervorhebt.

Weiterhin zeigte die *tof2*-Deletionsmutante synthetische Effekte mit epitopmarkierten Allelen von *CDC14* (Tabelle 4.1) und mit Deletionen der Gene *HCT1* und *LTE1* (Abbildung 4.23), positiven Regulatoren der Zelle für den Austritt aus der Mitose.

Die Analyse synthetisch kranker *tof2*-Deletionsmutanten, die ein epitopmarkiertes Allel von *CDC14* exprimieren, ergab keinen Hinweis auf die molekulare Funktion von Tof2 innerhalb der Cdc14 Regulation. Der Phänotyp der Mutanten war uneinheitlich. Die Zellen waren teilweise extrem groß, zeigten zerstörte Kerne und anomale Spindelstrukturen. Die Beobachtung, dass die N-terminalen Verkürzungen von *TOF2* keinen synthetischen Effekt mit epitopmarkierten Allelen von *CDC14* zeigten, weist darauf hin, dass nicht nur die Cdc14-Interaktionsdomäne von Tof2 an der Regulation der Phosphatase beteiligt zu sein scheint.

Grundsätzlich ist der Phänotyp der *tof2*-Deletionsmutanten unauffällig [Park & Sternglanz 1999] und die Progression durch den Zellzyklus weitestgehend normal mit geringen Defekten in der Anaphase/Telophase und der Zytokinese (Abbildung 4.24).

Die Kombination der *TOF2* Deletionen mit *hct1*- oder *lte1*-Deletionsmutanten zeigte, dass die Phänotypen der Zellen, in denen *HCT1* und *LTE1* deletiert sind, durch das zusätzliche Nichtvorhandensein der unterstützenden Wirkung von Tof2 auf Cdc14 leicht verstärkt werden (Abbildung 4.23). Die *HCT1* Deletion bzw. *LTE1* Deletion ist letal in Kombination mit den FEAR Mutanten *spo12-Δ* und *slk19-Δ* [Stegmeier *et al.* 2002], was Tof2 als eine Komponente des FEAR ausschließt. Tof2 könnte jedoch die Aktivität des über das FEAR Netzwerk freigesetzten Cdc14 noch zusätzlich stimulieren und somit Ereignisse der frühen Anaphase, die von Cdc14 vermittelt werden, positiv regulieren.

5.3 Tof2 - ein nukleolarer Aktivator der Phosphatase Cdc14, der die rDNA Trennung unterstützt

Jüngste Publikationen weisen auf eine Beteiligung der Phosphatase Cdc14 an der Stabilisierung und Assemblierung der mitotischen Spindel hin [Pereira & Schiebel 2003, Higuchi & Uhlmann 2005, Khmelinskii *et al.* 2007]. Ausgehend von der Beobachtung, dass *tof2*-Deletionsmutanten mit epitopmarkiertem *CDC14* auffällige Mikrotubulistrukturen in den extrem großen Zellen aufweisen, wurde die Mikrotubulistruktur in diesen Mutanten nach einer Elutriation genauer analysiert, um ausschließen zu können, dass der beobachtete Defekt eine Summe von fehlerhaften Abläufen in den kranken Zellen ist und nicht direkt die Folge des fehlenden Tof2. Defekte in der Mikrotubulistruktur konnten nach der Elutriation in den *tof2*-Deletionsmutanten nicht nachgewiesen werden (Abbildung 4.25).

Darüber hinaus ist die Trennung der rDNA ein frühes Ereignis in der Anaphase, das in Abhängigkeit der Cdc14 Phosphatase Aktivität erfolgt [Sullivan *et al.* 2004]. Die Trennung der rDNA unterscheidet sich vom Rest des Genoms. Die 5 µm lange rDNA Schleife muss für eine erfolgreiche Aufteilung auf die Mutter- und neu entstehende Tochterzelle extrem kompaktiert werden. Zudem ist es notwendig eine an diesem DNA-Locus bestehende Cohesin-unabhängige Kohäsion zu lösen, was durch die Cdc14-abhängige Relokalisation des heteropantameren Condesin Komplex an die rDNA erreicht wird [D'Amours *et al.* 2004, Sullivan *et al.* 2004, Wang *et al.* 2004, Machín *et al.* 2005]. Tof2 ist ein nukleolares Protein, das Funktionen der Phosphatase *in vitro* und *in vivo* unterstützt. Daher lag nahe, die Trennung der rDNA, um die sich der Nukleolus formt, nach einer Deletion von *TOF2* genauer zu

untersuchen. Dazu wurde der etablierte nukleolare Marker Net1, der an der rDNA lokalisiert ist und stabil mit dieser während der Anaphase assoziiert bleibt [Huang & Moazed 2003, Machín *et al.* 2005], herangezogen. Analysen der Net1 Trennung während der Anaphase, ließen Defekte der *tof2*-Deletionsmutante, was die Aufteilung des Nukleolus auf Mutter- und Tochterzelle betraf, erkennen. Eine zeitliche Abschätzung der Net1 Trennung belief sich in einer asynchronen Kultur von *tof2*-Deletionsmutanten auf circa 50 Minuten vom Beginn der Anaphase bis zur Detektion komplett getrennter Nukleoli, bei dem Kontrollstamm wurde dagegen die Dauer der Nukleolustrennung auf 25 Minuten abgeschätzt (Abbildung 4.26).

Die Analyse der Nukleolustrennung in synchronen Kulturen bestätigte die zeitlich verzögerte Trennung des Nukleolus in den *tof2-Δ* Mutanten (Abbildung 4.27 A & B). Zwar belief sich in diesem experimentellen Ansatz die zeitliche Verzögerung zwischen der Mutante und dem Kontrollstamm nur auf 5-10 Minuten im Unterschied zu 25 Minuten in den asynchronen Kulturen, jedoch könnte die Überexpression von *CDC20*, die in diesem Experiment nach dem Arrest in der Metaphase für ein wieder Eintreten der Stämme in den Zellzyklus sorgte, eine mögliche Erklärung dafür sein.

Weiterhin konnte ausgeschlossen werden, dass die verzögerte Trennung der rDNA in der *tof2*-Deletionsmutante auf die fehlende Interaktion mit der Topoisomerase I [Park & Sternglanz 1999] zurückzuführen ist. DNA Topoisomerasen führen Einzel- und Doppelstrang-Brüche in die DNA ein und sind auf diese Weise an der Entwindung von DNA beispielsweise während der Replikation beteiligt. Aufgrund dieser Funktionen im DNA-Metabolismus wäre es vorstellbar, dass DNA Topoisomerasen auch an der Trennung der rDNA beteiligt sind. Eine synchrone Kultur einer *top1-Δ* Mutante zeigte zwar eine beeinträchtigte Trennung des Nukleolus jedoch nicht in dem Maß wie es für die *tof2*-Deletionsmutante beobachtet werden konnte (Abbildung 4.27 B & C). Tetradenanalysen von heterozygot diploiden Stämmen *top1-Δ/TOP1 cdc14-3/CDC14* und *top1-Δ/TOP1 CDC14^{h10}/CDC14* machten außerdem deutlich, dass die Kombination der Deletion von *TOP1* mit beeinträchtigten Allelen von *CDC14* keine bzw. nur geringe synthetische Effekte aufzeigte (Abbildung 4.28), woraus zu schließen ist, dass die Defekte in der Trennung des Nukleolus in *top1*-Deletionsmutanten unabhängig von Cdc14 sind. Dies wiederum unterstreicht die Abhängigkeit der zeitlich verzögerten Trennung des Nukleolus in *tof2*-Deletionsmutanten von Cdc14.

Für eine erfolgreiche Trennung des Nukleolus ist die Kompaktierung und Trennung der rDNA durch Condensin notwendig, das Cdc14-abhängig innerhalb der Anaphase im Nukleolus lokalisiert [D'Amours *et al.* 2004, Wang *et al.* 2004]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Anaphase-spezifische Relokalisation von Condensin an die rDNA

in *tof2*-Deletionsmutanten beeinträchtigt ist (Abbildung 4.29). Eine weitere Beobachtung, die das Zusammenspiel von Tof2 und Cdc14 bei der Trennung der rDNA belegt.

Dass Tof2 Cdc14 spezifisch bei der rDNA Trennung unterstützt, wurde zusätzlich durch die Beobachtung manifestiert, dass die Letalität der Doppelmutante *tof2-Δ cdc14-3* durch die Deletion des rDNA Locus supprimiert wird (persönliche Mitteilung Michael Schwab), wobei die Trippelmutante mit der Deletion von *RDN1* durch eine rDNA Kopie auf einem 2μ Plasmid am Leben erhalten wurde (NOY908) [Wai *et al.* 2000]. Wie bereits erwähnt, ist im Unterschied zur *tof2-Δ cdc14-3* Doppelmutante die Doppelmutante aus *net1-Δ* und *cdc14-3* lebensfähig. Die Deletion von *NET1* hat zur Folge, dass der rDNA Trennungsdefekt der *cdc14-3* Mutante abgeschwächt ist [Tomson *et al.* 2006], während die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse darauf hindeuten, dass die Deletion von *TOF2* den Phänotyp der *cdc14-3* Mutante noch verstärkt und zu einer verzögerten rDNA Trennung führt. All diese Ergebnisse machen deutlich, dass sich Sequenz- und somit Funktionsähnlichkeit nicht gegenseitig bedingt.

Es scheint zunächst verwunderlich, dass sich zwei Proteine, die Sequenzähnlichkeiten aufweisen, in ihrer Funktion so unterschiedlich verhalten. Eine mögliche Erklärungshilfe könnte ein mutiertes Allel von *NET1* bieten. Es entstand in einer Zufallsmutagenese, innerhalb derer nach *NET1* Derivaten gesucht wurde, deren Überexpression nicht mehr toxisch ist für Hefezellen [Bücker 2006]. Das auf diese Weise erhaltene mutagenisierte Net1 enthielt einen Aminosäureaustausch an Position 72 (R72G), wobei es sich um eine nicht konservierte Aminosäure zwischen Net1 und Tof2 handelt. Das mutagenisierte Net1 war noch in der Lage, Cdc14 zu binden und lokalisierte im Nukleolus, eine Überexpression war jedoch weniger toxisch, wobei die Toxizität einer Überexpression von *NET1* durch seine inhibitorische Wirkung auf die Phosphatase Cdc14 erklärt werden kann [Visintin *et al.* 1999]. Die *in vitro* Messung der Phosphatase Aktivität nach der Zugabe eines N-terminalen Fragments des mutagenisierten Net1, Net1* 1-341, zeigte, dass zwar noch eine inhibitorische Wirkung auf die Phosphatase Cdc14 besteht, jedoch nicht in dem Maße wie das für den nicht mutagenisierte N-terminale Bereich von Net1 detektiert werden konnte (Abbildung 4.18 A). Bindung und Modulierung der Cdc14 Aktivität sind wohl voneinander zu trennen, so dass die Annahme nahe liegt, dass eine Cdc14 Interaktion durch die zwischen Tof2 und Net1 konservierten Aminosäuren bewerkstelligt wird, während Aktivierung versus Inhibition von den nicht-konservierten Aminosäuren bedingt ist, da die veränderte Stärke der Inhibition des mutierten Net1 Fragments durch die Veränderung einer einzigen nicht-konservierten Aminosäure hervorgerufen wird. Außerdem wurde bereits in Shou *et al.* 1999 auf die

Existenz einer *net1* Mutante (*net1-1*) hingewiesen, die zwar die Cdc14 Lokalisation im Nukleolus gewährleistet, jedoch fähig ist eine MEN-Mutante zu supprimieren, was durch eine verringerte Inhibition der Phosphatase durch die *net1-1* Mutante erklärt werden könnte.

5.4 Modell zur Regulation von Cdc14 durch Tof2

Es konnte gezeigt werden, dass das nukleolare Protein Tof2, das Sequenzähnlichkeiten mit der Cdc14 Interaktionsdomäne von Net1 aufweist, direkt an die Phosphatase Cdc14 bindet. Im Gegensatz zu Net1 ist Tof2 jedoch kein Inhibitor von Cdc14. Darüber hinaus handelt es sich bei Tof2 um ein Cdc14 stimulierendes Protein, das die Phosphatase Aktivität *in vitro* positiv reguliert und die biologische Funktion von Cdc14 *in vivo* unterstützt. Der letzte Punkt konnte durch die Suppression der *cdc15-2* Mutante durch die Überexpression von *TOF2* (persönliche Mitteilung Michael Schwab) und die Letalität einer *cdc14-3* Mutante in Kombination mit der Deletion von *TOF2* eindeutig belegt werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass Tof2 während des gesamten Zellteilungszyklus im Nukleolus lokalisiert selbst in der Anaphase, wenn Cdc14 freigesetzt ist. Auch unter den fokussierten Bedingungen eines Anaphase Arrests ist eine nukleolare Lokalisation von Tof2 zu detektieren. Die Untersuchung der Tof2 Abhängigkeit Cdc14-vermittelter Funktionen, die die Phosphatase innerhalb des Nukleolus ausübt wie die Initiierung der rDNA Trennung, lag also nahe. *tof2*-Deletionsmutanten zeigen nicht nur eine verzögerte Trennung der rDNA, sondern auch eine verringerte Anaphase-sezifische Relokalisation von Condensin an die rDNA. Außerdem konnte die Lebensfähigkeit einer *tof2-Δ cdc14-3* Doppelmutante durch die Deletion der chromosomalen rDNA Kopie wieder hergestellt werden (persönliche Mitteilung Michael Schwab). Innerhalb dieser Arbeit war es also möglich, eine unterstützende Wirkung von Tof2 auf Cdc14 bei der rDNA Trennung herauszuarbeiten. Tof2 könnte basierend auf den erhaltenen Daten aktives Cdc14 während der Anaphase im Nukleolus zurückhalten und somit die rDNA auf ihre Trennung vorbereiten, indem Bedingungen geschaffen werden, die eine Cdc14-abhängige Rekrutierung des Condensinkomplexes erleichtern.

Zudem deuten die erhaltenen Ergebnisse an, dass Tof2 keine Komponente des FEAR und MEN Signalwegs ist und somit nicht essentiell für eine Freisetzung der Phosphatase in der Anaphase. Auch die Lokalisationsanalysen von Cdc14 in *tof2-Δ* Mutanten schließen eine Beteiligung von Tof2 bei der Entlassung von Cdc14 aus dem Nukleolus eher aus, da weder eine verfrühte Freisetzung, was für einen Inhibitor der Phosphatase zu erwarten gewesen wäre, noch eine verspätet Entlassung, was den in dieser Arbeit erhaltenen Daten entsprechen

würde, zu detektieren war. Eine mögliche Bedeutung von Tof2 bei der Freisetzung der Phosphatase kann jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Um die genaueren Mechanismen der rDNA Trennung und die Beteiligung von Tof2 an diesem Prozess zu klären, wäre die Identifikation von Zielproteinen für Cdc14 an der rDNA von Interesse. Cdc14 könnte durch die Dephosphorylierung möglicher Strukturkomponenten der rDNA die Zugänglichkeit dieses DNA Locus so modifizieren, dass eine erfolgreiche Bindung von Condensin möglich wird und somit eine korrekte Kompaktierung und Trennung der rDNA erfolgt.

Als ein weiteres Modell wäre denkbar, dass über Tof2 permanent ein Pool von aktivem Cdc14 an der rDNA gebunden wird. Die Bedeutung von permanent aktivem Cdc14 im Nukleolus müsste jedoch in diesem Zusammenhang noch geklärt werden. Es wäre denkbar, dass verschiedene Strukturen bzw. Beschaffenheiten der rDNA während des Zellteilungszyklus durch permanent aktives Cdc14 im Nukleolus moduliert werden.

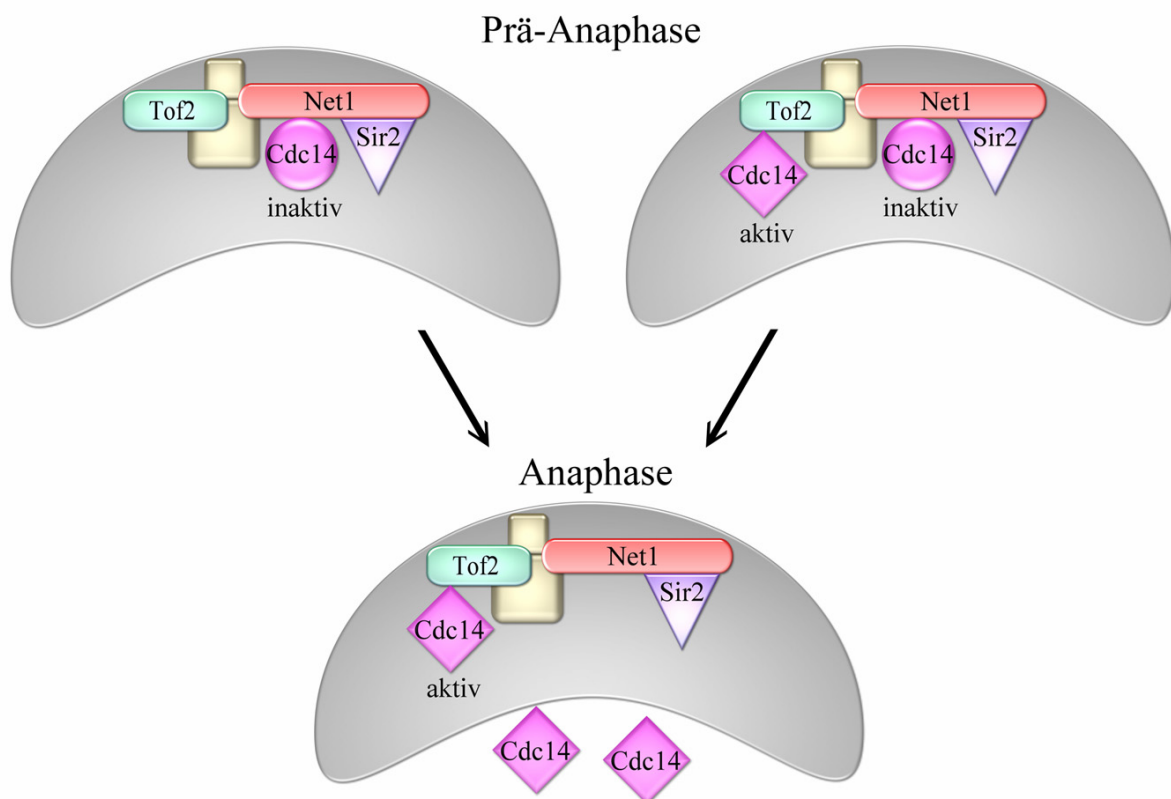


Abbildung 5.1: Modell der Cdc14 Regulation durch Tof2

Bis zur Metaphase wird Cdc14 über Net1 im Nukleolus verankert und inhibiert. Mit Tof2 konnte eine neue Komponente in der Cdc14 Regulation identifiziert werden, die direkt mit Cdc14 interagiert jedoch im Gegensatz zu Net1 die Phosphatase nicht inhibiert sondern deren Aktivität stimuliert und die Trennung der rDNA positiv reguliert. Somit ergibt sich ein neuer Gesichtspunkt in der Regulation der Phosphatase. Nach der Freisetzung von Cdc14 zu Beginn der Anaphase könnte Tof2 einen Pool an aktivem Cdc14 im Nukleolus zurückhalten, der die Struktur der rDNA für eine korrekte Lokalisation von Condensin an diesen DNA Locus modifiziert, so dass

die rDNA in einer Condesin-abhängigen Weise kompaktiert und getrennt werden kann. Weiterhin wäre vorstellbar, dass während des gesamten Zellzyklus ein geringer Teil von Cdc14 aktiv im Nukleolus verankert wird, dessen Funktion bzw. Bedeutung während des Zellteilungszyklus noch untersucht werden müsste.

6. MATERIAL

6.1 Antikörper

Primäre Antikörper:

(WB: Western-Blot, IF: Immunfluoreszenz)

9E10	1:100	WB	Monoklonaler Mausantikörper gegen das c-myc-Epi-
	1:20	IF	top [Evan <i>et al.</i> 1985]
A14	1:80	IF	Polyklonales Kaninchenantiserum gegen das c-myc- Epitop (Santa Cruz Biotechnology)
12CA5	1:250	WB	Monoklonaler Mausantikörper gegen das ha-Epitop
	1:10	IF	[Field <i>et al.</i> 1988]
Y11	1:50	IF	Polyklonales Kaninchenantiserun gegen das ha-Epitop (Santa Cruz Biotechnology)
YOL1/34	1:100	IF	Monoklonaler Rattenantikörper gegen Tubulin
tetra-His	1:2000	WB	Monoklonaler Mausantikörper gegen 4- oder 6xHistidin (Qiagen)
α -Cdc14	1:250	IF	Polyklonales Kaninchenantiserum gegen Cdc14 (Santa Cruz Biotechnology)
α -Clb2	1:5000	WB	Polyklonales Kaninchenantiserum gegen Clb2 [Amon <i>et al.</i> 1994]
α -Sic1	1:10.000	WB	Polyklonales Kaninchenantiserum gegen Sic1 [Skowyra <i>et al.</i> 1997]

Sekundäre Antikörper:

Anti-Maus-Alexa 488	1:250	IF	(MoBiTec)
Anti-Maus-Alexa 546	1:250	IF	(MoBiTec)
Anti-Kaninchen-Alexa 488	1:250	IF	(MoBiTec)
Anti-Kaninchen-Alexa 546	1:250	IF	(MoBiTec)
Anti-Ratte-Alexa 546	1:250	IF	(MoBiTec)
Schaf-Anti-Kaninchen-IgG HRP	1:5000	WB	(Dianova)
Schaf-Anti-Maus-IgG HRP	1:2500	WB	(Dianova)

6.2 Enzyme

Alkalische Phosphatase (Shrimp)	Fermentas
KOD Hot Start Polymerase	Novagene
Lysozym	Fluka
Novozym 234	NovoBiolabs
Proteinase K	AppliChem
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs und Roche
RNAase A	Roche
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs und Roche
<i>Taq</i> -Polymerase	Biomaster und Qiagen
Zymolyase 20T	Seikagaku, Tokio

6.3 Nukleinsäuren

dNTPs	New England Biolabs und Novagene
GeneRuler™ DNA-Längenstandard	Fermentas
Lachssperma-DNA	Sigma
Oligonukleotide	MWG-Biotech, metabion AG

6.4 Geräte

AxioCam MRm	Zeiss
Brutschrank Tv50b	Memmert
Brutschrank WB 120 K	Mytron
Digitalkamera Cyber-Shot 3.3	Sony
Digitalkamera E10, E500	Olympus
Digitalwaage	Kern EW
Durchflußzytometer CA-III	Partec
Elektroblotapparatur Semi-Dry SEDEC M	Peqlab Biotechnology GmbH
Elektroporationsapparatur EasyjecT Prima	EquiBio
Feinwaage AE50	Mettler
French Press	American Instrument Company
Gelapparatur für Acrylamidgele	Biometra (Minigel TwinG42)
Gelapparatur für Agarosegele	Hoefer (Modell HE33)

Geltrockenapparatur	LKB Bromma
Heizblock	Peqlab Biotechnology GmbH
Kamera CF 8/1 PX	Kappa
Magnetrührer MR2000 und MR2002	Heidolph
Mikroskop Axioplan2, Axio Imager	Zeiss
Mikroskop Standard 25, AxioStar	Zeiss
Mikromanipulator	MSM System Singer Instruments
pH-Meter 766 Caltimatic	Knick
Photometer	Pharmacia
Pipetierhilfe Easypet	Eppendorf
Reaktionsgefäßroller Modell 34528	Snijders Scientific
Reagenzglasroller TC 7	New Brunswick Scientific
Retsch Schwingmühle MM200, MM2000	Kurt Retsch GmbH
Rotator	neoLab
Schüttel Inkubator G24	New Brunswick Scientific
Schüttler VORTEMP56 EVC	Labnet International Inc.
Schüttelwasserbad	New Brunswick Scientific, Infors AG
Sonicator W385	Ultrasonic
Sonoplus Homogenisator HD2070	Bandelin
Spannungsgeräte EV243, E122, E844	Consort
Spektrophotometer Novaspec II	Amersham Pharmacia Biotech
Thermocycler Primus 25	Peqlab Biotechnology GmbH
UV-Stratalinker 1800	Stratagene
UV-Tisch TF-20 M	Vilbert Lourmat
Vortex Mixer	neoLab
Wippschüttler ST 5 CAT	neoLab
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf
Zentrifuge 5810	Eppendorf
Zentrifuge Kühlzentrifuge RC-5B	Sorvall
Zentrifuge Multifuge 3L	Heraeus

6.5 Chemikalien

1-Butanol p.a.	Merck, Darmstadt
Aceton p.a.	Roth, Karlsruhe
Acrylamid 30% / Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Adeninsulfat	AppliChem, Darmstadt
Agarose	Invitrogen, Karsruhe; Gibco BRL, Paisley
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Aminosäuren	AppliChem, Darmstadt
Ampicillin	Biomol, Hamburg; Roth, Karlsruhe
Bacto Agar	Difco, Detroit; Becton, Dickinson & Co.
Bacto Pepton	Difco, Detroit; Becton, Dickinson & Co.
Bacto Trypton	Difco, Detroit; Becton, Dickinson & Co.
Bacto Yeast Extract	Difco, Detroit; Becton, Dickinson & Co.
β -Glycerolphosphat	Fluka, Deisenhof
β -Mercaptoethanol	Fluka, Deisenhof
Bradfordreagenz	BioRad, München
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
clonNAT (Nourseothricin)	Werner BioAgents
ConA-FITC	Roth, Karlsruhe
DAPI	Sigma, St.Louis
D-Galaktose	Gerbü, Gaiberg
D-Glucose	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg
D-Raffinose	Sigma, St.Louis; Serva, Heidelberg
D-Saccharose	Roth, Karlsruhe
D-Sorbitol	Serva, Heidelberg
EDTA	Gerbü Trading GmbH
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol p.a.	Roth, Karlsruhe; J.T. Backer, Griesheim
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Euroagar	Difco, Detroit; Th. Geyer
Formaldehyd (37%)	Fluka, Deisenhofen
G418-Sulfat	Calbiochem, San Diego

Glycerin	Roth, Karlsruhe
Hydroxyharnstoff	AppliChem, Darmstadt
Igepal CA-630	Sigma, St. Louis
Imidazol	Fluka, Deisenhofen
IPTG	AppliChem, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt; Fluka, Deisenhofen
Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Lithiumacetat	Fluka, Deisenhofen
Magermilchpulver	Humana Milchunion Lasana
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt; Sigma, St. Louis
Methanol p.a.	Roth, Karlsruhe
Mounting Medium	Southern Biotechnology, Birmingham
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg
Natriumfluorid	Fluka, Deisenhofen
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Nocodazol	Fluka, Deisenhofen
Polyethylenglykol PEG 3350	Sigma, St. Louis
Polylysin	Sigma, St. Louis
Ponceau S	Fluka, Deisenhofen
RAPID Stain™	G-Bioscience, St. Louis
Rhamnose	AppliChem
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SytoxGreen	Invitrogen, Karlsruhe
TEMED	Fluka, Deisenhofen
Tris-Base	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Fluka, Deisenhofen
Uracil	AppliChem, Darmstadt
X-Gal	AppliChem, Darmstadt

Xylen Cyanol	Serva, Heidelberg
Yeast Nitrogen Base	Difco, Detroit; Becton, Dickinson & Co.

6.6 sonstige Materialien

Amylose Resin E8021S	New England Biolabs
BM Chemiluminescence Blotting Substrat	Roche
Deckgläser 22 x 22 mm	Marienfeld GmbH & Co.KG
Deckgläser 24 x 60 mm	Menzel Glasbearbeitung GmbH & Co.KG
Dialysemembran VSWP 0,025µm	Millipore
DV-B BLUE Röntgenfilme	Typon Röntgenfilm GmbH
Elektroporationsküvetten	Equibio, Peqlab Biotechnologie GmbH
Frogger	DAN-KANN Corp.
Gasperlen (0,45-0,5 mm)	BraunBiotech
Impfösen (steril)	neoLab
Immersionsöl 518F	Zeiss
JETSPIN Plasmid MidiprepKit	Genomed
Küvetten	Sarstedt AG & Co.
Multiwell Objektträger	ICN; MP Biomedicals, Inc.
Nitrocellulose-Membran	Schleicher & Schuell
NucleoSpin®	Machery-Nagel
Objektträger 76 x 76 mm	Menzel Glasbearbeitung GmbH & Co.KG
Protein A-Agarose	Santa Cruz Biotechnology
Proteinstandard	New England Biolabs, BioRad
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick® Gel PCR Purification Kit	Qiagen
RAPID Stain™	Bioscience
Rinderserumalbumin	Sigma
S/W Filmentwickler und Fixierer	Adefo Chemie GmbH; Tetenal
Sterilfilter (0,2 µm)	Schleicher & Schuell; Nalgel Nunc Corp.
Whatman GB005	Schleicher & Schuell
Zentrifugenröhrchen SS34	Sorvall

6.7 Medien

6.7.1 Bakterienmedien

LB-Flüssigmedium:

Bacto Trypton	10 g/l
Bacto Yeast Extract	5 g/l
NaCl	10 g/l
NaOH	0,3 mM

Zur Herstellung von LB-Agarplatten wurden 1,7% (w/v) Euroagar eingesetzt. Für Selektivmedien bzw. -agar wurde das entsprechende Antibiotikum in der gewünschten Konzentration zugesetzt. Im Falle des Vorhandenseins eines Ampicillinresistenzgens erfolgte die Zugabe von Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml. Auf Chloramphenicolresistenz wurde durch Zugabe von 50 µg/ml Chloramphenicol in Flüssigmedium selektiert. Zu LB-Agarplatten wurde Chloramphenicol in einer Endkonzentration von 34 µg/ml gegeben.

Für die Induktion von Proteinexpression in *E. coli* wurde dem Medium Rhamnose (2%) zugesetzt.

TB-Flüssigmedium:

Bacto Trypton	12 g/l
Bacto Yeast Extract	24 g/l
Glycerin	4 ml
Wasser	ad 900 ml

Nach dem Autoklavieren:

0,17 M KH ₂ PO ₄ ; 0,72 M K ₂ HPO ₄	100 ml
---	--------

SOC:

Bacto Trypton	20 g/l
Bacto Yeast Extract	5 g/l
NaCl	10 mM
Bacto Trypton	20 g/l

Nach dem Autoklavieren:

Glucose	20 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM

6.7.2 Hefemedien

Vollmedium fl. (XY):

Bacto Pepton	20 g/l
Bacto Yeast Extract	10 g/l
Adenin	0,1 g/l
KH ₂ PO ₄	10 mM
Tryptophan	0,2 g/l
Zucker (nach dem Autoklavieren)	20 g/l

Selektivmedium fl. (S):

10x Yeast Nitrogen Base	100 ml/l
10x Dropout-5	100 ml/l
Zucker (nach dem Autoklavieren)	20 g/l

In Abhängigkeit der Auxotrophiemarker der zu kultivierenden Stämme wurden Adenin (50 mg/l), Histidin (50 mg/l), Leucin (100 mg/l), Tryptophan (100 mg/l) oder Uracil (50 mg/l) je nach Bedarf zu dem jeweiligen Selektivmedium hinzugefügt. Die entsprechenden Zucker wurden steril nach dem Autoklavieren zum Medium in einer Enkonzentration von 2% zugesetzt (20% Glucose-Lösung wurde autoklaviert, 20% Galaktose und 10% Raffinose wurden sterilfiltriert). Für die Herstellung von festen Medien wurden 1,7% (w/v) BactoAgar zugegeben.

Toxine zur Selektion resistenter Hefeklone wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt:

G418	500 µg/ml für den Stammhintergrund W303
clonNAT	100 µg/ml

MATERIAL

Präsporulationsmedium:

Adenin	50 mg/l
Bacto Pepton	3 g/l
Bacto Yeast Extract	8 g/l
Glucose	100 g/l

Sporulationsmedium:

Bacto Yeast Extract	1 g/l
Kaliumacetat	10 g/l
Glucose	0,5 g/l
10x Dropout ++	0,1x

10x Dropout++:

Adenin	500 mg/l
Alanin	1000 mg/l
Arginin	500 mg/l
Asparagin	500 mg/l
Asparaginsäure	1000 mg/l
Cystein	500 mg/l
Glutamin	500 mg/l
Glutaminsäure	500 mg/l
Glycin	500 mg/l
Histidin	1000 mg/l
(myo-)Inositol	500 mg/l
Isoleucin	500 mg/l
Leucin	50 mg/l
Lysin	500 mg/l
Methionin	500 mg/l
p-Aminobenzoessäure	1000 mg/l
Phenylalanin	1000 mg/l
Prolin	500 mg/l
Serin	1000 mg/l
Threonin	500 mg/l
Tryptophan	1000 mg/l

Tyrosin	500 mg/l
Uracil	500 mg/l
Valin	1000 mg/l

Das 10x Dropout++ wurde sterilfiltriert und dunkel bei 4°C aufbewahrt.

Bei der Herstellung des Dropout -5 wurden Adenin, Histidin, Leucin, Tryptophan und Uracil nicht zugefügt.

10x Yeast Nitrogen Base:

Ammoniumsulfat	50 g/l
Yeast Nitrogen Base	17 g/l
(sterilfiltriert, Lagerung bei 4°C)	

6.8 Puffer und Lösungen

Ampicillin (1000x):

Ampicillin in 50% Ethanol	100 mg/ml
---------------------------	-----------

Agarosegel-Ladepuffer:

Bromphenolblau	2,5 mg/ml
EDTA	1 mM
Glycerin	300 mg/ml
Tris/HCl (pH 7,8)	10 mM
Xylen Cyanol	2,5 mg/ml

Cdc14-Puffer (Messung der Phosphatase Aktivität):

EDTA	1 mM
DTT	1 mM
Imidazol pH 6,9	50 mM

Chloramphenicol (1000x):

Chloramphenicol in 100% Ethanol	50 mg/ml
---------------------------------	----------

MATERIAL

ConA-FITC:

ConA-FITC	5 mg/ml
CaCl ₂	100 µM
HEPES (pH 8,5)	10 mM

DAPI-Reagenz:

DAPI	100 µg/ml
Glycerin	900 mg/ml
PBS (pH 7,2)	0,1%
p-Phenylendiamin	1 mg/ml
(DAPI-Reagenz 1:100 in Mounting Medium)	

EasyPrep Puffer:

BSA	0,1 mg/ml
EDTA	1 mM
Lysozym	2 mg/ml
RNaseA	0,2 mg/ml
Saccharose	150 mg/ml
Tris/HCl (pH 8,0)	10 mM

F1-Puffer (Zellsuspension):

EDTA	10 mM
RNase	100 µg/ml
Tris/HCl (pH 8,0)	50 mM

F2-Puffer (Zelllyse):

NaOH	200 mM
SDS	1%

F3-Puffer (Neutralisation, Bindung): Acetat, Guanidine Hydrochloride

MATERIAL

F4-Puffer (Waschen):

EDTA	0,33 mM
Ethanol	70%
NaCl	167 mM
Tris/HCl (pH 7,5)	33,3 mM

Kolonie-Puffer:

Tris/HCl (pH 8,5)	0,125 M
KCl	0,56 M

LRB (Lämmli Laufpuffer 10x):

Glycin	1,92 M
SDS	10 g/l
Tris-Base	250 mM

LRB (Turbo) (Lämmli Laufpuffer 10x):

Glycin	9,46 M
SDS	10 g/l
Tris-Base	250 mM

LSB (Lämmli Auftragspuffer 2x):

β -Mercaptoethanol	10%
Bromphenolblau	400 μ g/ml
Glycerin	200 mg/ml
SDS	40 mg/ml
Tris/HCl (pH 6,8)	120 mM

mbp-Puffer:

DTT	1 mM
EDTA	1 mM
NaCl	200 mM
Tris/HCl (pH 7,4)	20 mM

MATERIAL

Novozymmedium:

Dithiothreitol	50 mM
EDTA	1 mM
Novozym	2 mg/ml
Sorbitol	1 M
Tris/HCl	10 mM

PBS 1x (pH 7,2):

NaCl	100 mM
NaH ₂ PO ₄	17 mM
Na ₂ HPO ₄	33 mM

pH mit NaOH auf 7,2 einstellen

Ponceau S:

Eisessig	50 ml/l
Ponceau S	1 g/l

Proteinase K:

CaAcetat	1 mM
Proteinase K	10 mg/ml
Tris/ HCl (pH 7,5)	10 mM

Puffer B:

K ₃ PO ₄ (pH 7,4)	100 mM
Sorbitol	1,2 M

Puffer 3:

EDTA	5 mM
Igepal CA-630	0,1%
NaCl	100 mM
NaF	50 mM
Tris/HCl (pH 7,5)	50 mM
(β-Glycerolphosphat	60 mM)

MATERIAL

Reaktionspuffer (Messung der Phosphatase Aktivität):

EDTA	1 mM
DTT	1 mM
Imidazol pH 6,9	50 mM
pNPP	20 mM

RNase:

NaCl	15 mM
RNase	10 mg/ml
Tris/HCl (pH 7,5)	10 mM

(15 min aufgekocht, langsam abgekühlt)

Sammelgel:

Wasser	1,5 ml
Tris/HCl (pH 6,8)	0,63 ml
Acrylamid	0,35 ml
10% SDS	25 µl
APS	25 µl
TEMED	2,5 µl

Trenngel (9%):

Wasser	2,6 ml
Tris/HCl (pH 6,8)	1,5 ml
Acrylamid	1,8 ml
10% SDS	60 µl
APS	37,5 µl
TEMED	3,5 µl

Stopp-Lösung (Messung der Phosphatase Aktivität):

NaOH	0,25 N
------	--------

TAE (50x):

Tris-Acetat (pH 8,0)	2 M
EDTA	50 mM

TBS (10x):

Tris/HCl (pH 7,6)	200 mM
NaCl	1,37 M

TBS-T:

10x TBS	100 ml/l
10% Tween 20	10 ml/l

TE (10x):

Tris/HCl (pH 7,5)	200 mM
EDTA	10 mM

Transferpuffer:

Glycin	2,9 g/l
Methanol	100ml/l
10% SDS	3,7 ml/l
Tris-Base	5,8 g/l

6.9 Bakterienstämme

Tabelle 6.1: Zusammenfassende Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Stämme

Stamm	Relevanter Genotyp
DH5 α	<i>F⁻ supE44 Δ(lacZYA-argF)U169 f80LacZΔM15 hsdR17(rk⁻, mk⁺) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA deoR phoA tonA</i>
BL21Codon+	<i>F⁻ ompT hsdSB (rB-mB⁻) gal dcm (DE3) pLysS (CamR)</i>

6.10 Hefestämme

Tabelle 6.2: Zusammenfassende Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme

(SH: Stammhintergrund, Sammlung: Stammsammlung der Arbeitsgruppe Prof. Dr. W. Seufert)

Stamm	Relevanter Genotyp	SH	Quelle
K699	<i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11,-15 leu2-2,-112 trp1-1 ura3-2 ssd1</i>	W303	Sammlung
K700	<i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11,-15 leu2-2,-112 trp1-1 ura3-2 ssd1</i>	W303	Sammlung
K842	<i>MATa/α ade2-1/ade2-1 can1-100/can1-100 his3-11,-15/his3-11,-15 leu2-2,-112/leu2-2,-112, trp1-1/trp1-1 ura3-2/ura3-3 ssd1/ssd1</i>	W303	Sammlung
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	S288C	Brachmann <i>et al.</i> 1998
W9313	<i>MATa cdc15-2</i>	W303	Sammlung
CY682	<i>MATa cdc14-3</i>	3.Rückkreuzung gegen W303	Sammlung
W320	<i>MATa hct1-Δ::LEU2</i>	W303	Sammlung
W1137	<i>MATa CDC14^{h10}-LEU2</i>	W303	Sammlung
W1472	<i>MATα NET1^{m9}-TRP1</i>	W303	Sammlung
W1658	<i>MATa CDC14^{h4}-LEU2</i>	W303	Sammlung
W1888	<i>MATα lte1-Δ::HIS3MX6</i>	W303	Sammlung
W2103	<i>MATa CDC14^{h10}-LEU2 NET1^{m9}-TRP1</i>	W303	Sammlung
W4542	<i>MATa TOF2^{m13}-HIS3MX6</i>	W303	Sammlung
W4543	<i>MATa CDC14^{h10}-LEU2 TOF2^{m13}-HIS3MX6</i>	W303	Sammlung
W4639	<i>MATa CDC14^{h10}-LEU2 NOP1^{m13}-HIS3MX6</i>	W303	Sammlung
W4641	<i>MATa tof2-Δ::HIS3MX6</i>	W303	Sammlung
W4754	<i>MATα CDC14^{h10}-LEU2</i>	W303	Sammlung
W4757	<i>MATα net1-Δ::HIS3MX6</i>	W303	Sammlung
W4765	<i>MATa tof2-Δ::HIS3MX6 cdc15-2</i>	W303	Sammlung
W4971	<i>MATα tof2-Δ::HIS3MX6</i>	W303	diese Arbeit
W5091	<i>tof2-Δ::HIS3MX6 CDC14^{h4}-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W5096	<i>MATα CDC14^{m9}-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W5225	<i>MATa tof2-Δ::HIS3MX6 hct1-Δ::LEU2</i>	W303	diese Arbeit

W5226	<i>MATa tof2-Δ::HIS3MX6 hct1-Δ::LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W5227	<i>MATa tof2-Δ::NATMX4</i>	W303	diese Arbeit
W5228	<i>MATa tof2-Δ::NATMX4</i>	W303	diese Arbeit
W5301	<i>MATa tof2-Δ::NATMX4 lte1-Δ::HIS3MX6</i>	W303	diese Arbeit
W5302	<i>MATa tof2-Δ::NATMX4 lte1-Δ::HIS3MX6</i>	W303	diese Arbeit
W5306	<i>MATa/α tof2-Δ::NATMX4/tof2-Δ::HIS3MX6 NET1^{m9}-TRP1/NET1</i>	W303	diese Arbeit
W5385	<i>MATa/α CDC14^{h3}-KANMX6/CDC14</i>	W303	diese Arbeit
W5410	<i>MATa/α CDC14^{h3}-KANMX6/CDC14 NET1^{m9}-TRP1/NET1</i>	W303	diese Arbeit
W5411	<i>MATa/α CDC14^{h3} 1-374-KANMX6/CDC14 NET1^{m9}-TRP1/NET1</i>	W303	diese Arbeit
W5412	<i>MATa/α CDC14^{h3} 1-356-KANMX6/CDC14 NET1^{m9}-TRP1/NET1</i>	W303	diese Arbeit
W5525	<i>MATa/α CDC14^{h3} 1-374-KANMX6/CDC14 TOF2^{m13}-HIS3MX6/TOF2</i>	W303	diese Arbeit
W5526	<i>MATa/α CDC14^{h3} 1-356-KANMX6/CDC14 TOF2^{m13}-HIS3MX6/TOF2</i>	W303	diese Arbeit
W5549	<i>MATa/α tof2-Δ::NATMX4/TOF2 CDC14^{h4}-LEU2/CDC14</i>	W303	diese Arbeit
W5550	<i>MATa/α tof2-Δ::NATMX4/ tof2-Δ::HIS3MX6 CDC14^{h4}-LEU2/CDC14</i>	W303	diese Arbeit
W5563	<i>MATa cdc20-Δ::LEU2 ade::pGALL-CDC20-tCYC1-ADE tof2-Δ::HIS3MX6 NET1^{m9}-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W5567	<i>MATa cdc20-Δ::LEU2 ade::pGALL-CDC20-tCYC1-ADE NET1^{m9}-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W5598	<i>MATa/α CDC14^{h3}-KANMX6/CDC14 TOF2^{m13}-HIS3MX6/TOF2</i>	W303	diese Arbeit
W5620	<i>MATa leu2::pGALL-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W5624	<i>MATa CDC14^{h10}-LEU2 TOF2^{m13} 1-600-HIS3MX6</i>	W303	diese Arbeit
W5625	<i>MATa CDC14^{h10}-LEU2 TOF2^{m13} 1-341-HIS3MX6</i>	W303	diese Arbeit
W5626	<i>MATa CDC14^{h10}-LEU2 TOF2^{m13} 1-233-HIS3MX6</i>	W303	diese Arbeit
W5689	<i>MATa net1-Δ::HIS3MX6 CDC14^{h10}-LEU2 pTEF2-RRN3-tCYC1-URA (ARS/CEN)</i>	W303	diese Arbeit
W5690	<i>MATa net1-Δ::HIS3MX6 CDC14^{h10}-LEU2 pTEF2-RRN3-tCYC1-URA (ARS/CEN)</i>	W303	diese Arbeit
W5780	<i>MATa TOF2^{m13}-NATMX4</i>	W303	diese Arbeit
W5810	<i>MATa net1-Δ::HIS3MX6 CDC14^{h10}-LEU2 TOF2^{m13}-NATMX4 pTEF2-RRN3-tCYC1-</i>	W303	diese Arbeit

	<i>URA (ARS/CEN)</i>		
W5811	<i>MATα net1-Δ::HIS3MX6 CDC14^{h10}-LEU2 TOF2^{m13}-NATMX4 pTEF2-RRN3-tCYC1-URA (ARS/CEN)</i>	W303	diese Arbeit
W5820	<i>MATα cdc20-Δ::LEU2 ade::pGALL-CDC20-tCYC1-ADE top1-Δ::HIS3MX6 NET1^{m9}-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W5825	<i>MATα net1-Δ::HIS3MX6 CDC14^{h10}-LEU2 TOF2^{m13}-NATMX4</i>	W303	diese Arbeit
W5855	<i>NET1^{m9}-TRP1/NET1</i>	W303	diese Arbeit
W5943	<i>MATα/a tof2-Δ::NATMX4/ tof2-Δ::HIS3MX6 CDC14^{h4}-LEU2/CDC14</i>	W303	diese Arbeit
W6056	<i>MATα/a NET1^{h3}-KANMX6/NET1</i>	W303	diese Arbeit
W6057	<i>MATα/a NET1^{h3}-KANMX6/NET1 TOF2^{m13}-HIS3MX6/TOF2</i>	W303	diese Arbeit
W6058	<i>MATα/a TOF2^{h3}-HIS3MX6/TOF2</i>	W303	diese Arbeit
W6059	<i>MATα/a TOF2^{h3}-KANMX6/TOF2 NET1^{m9}-TRP1/NET1</i>	W303	diese Arbeit
W6172	<i>MATα cdc20-Δ::LEU2 ade::pGALL-CDC20-tCYC1-ADE CDC14^{h10}-LEU2 NET1^{m9}-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W6174	<i>MATα cdc20-Δ::LEU2 ade::pGALL-CDC20-tCYC1-ADE CDC14^{h10}-LEU2 TOF2^{m13}-HIS3MX6</i>	W303	diese Arbeit
W6175	<i>MATα ^{m9}CDC14</i>	W303	diese Arbeit
W6177	<i>MATα ^{m9}TOF2</i>	W303	diese Arbeit
W6179	<i>MATα ^{m9}TOF2 234-771</i>	W303	diese Arbeit
W6180	<i>MATα ^{m9}TOF2 234-771</i>	W303	diese Arbeit
W6181	<i>MATα ^{m9}NET1</i>	W303	diese Arbeit
W6183	<i>MATα ^{m9}NET1 234-1189</i>	W303	diese Arbeit
W6185	<i>MATα ^{m9}NET1 342-1189</i>	W303	diese Arbeit
W6437	<i>MATα ^{m9}TOF2 CDC14^{h10}-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W6440	<i>MATα ^{m9}TOF2 342-771 CDC14^{h10}-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W6441	<i>MATα ^{m9}TOF2 234-771 CDC14^{h10}-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W6595	<i>MATα leu2::pGAL1-NET1^{m9}-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W6598	<i>MATα leu2::pGAL1-TOF2^{m13}-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W6599	<i>MATα leu2::pGAL1-TOF2^{m13}-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W6679	<i>MATα/a SMC4^{m13}-KANMX6/SMC4 tof2-Δ::NATMX4/TOF2 NET1^{h3}-</i>	W303	diese Arbeit

	<i>KANMX6/NET1</i>		
W6680	<i>MATa/α SMC4^{m13}-KANMX6/SMC4 tof2-Δ::NATMX4/ tof2-Δ::HIS3MX6 NET1^{h3}-KANMX6/NET1</i>	W303	diese Arbeit
W6682	<i>MATa/α^{m9}NET1/net1-Δ::HIS3MX6 CDC14^{h10}-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W6683	<i>MATa/α^{m9}NET1 234-1189/net1-Δ::HIS3MX6 CDC14^{h10}-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W6684	<i>MATa/α^{m9}NET1 342-1189/net1-Δ::HIS3MX6 CDC14^{h10}-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W7036	<i>MATa/α ura3::pGAL1-CLB2-ΔDB-URA3 CDC14^{h10}-LEU2/CDC14 TOF2^{m13}-HIS3MX6/TOF2</i>	W303	diese Arbeit
W7045	<i>MATa/α NET1^{m9}-TRP1/NET1 leu2::pGAL1-TOF2-LEU2</i>	W303	diese Arbeit

6.11 Plasmide und Vektoren

Tabelle 6.3: Zusammenfassende Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

(Sammlung: Plasmidsammlung der Arbeitsgruppe Prof. Dr. W. Seufert)

Plasmid	Vektor	Beschreibung	Quelle
pFA6a-Derivate		Vektoren für PCR-vermittelte Genmanipulation (C-Terminus), Markeraustausch [Longtine <i>et al.</i> 1998]	Sammlung
pOM-Derivate mit pSH47		Vektoren für PCR-vermittelte Genmanipulation am N-Terminus [Gauss <i>et al.</i> 2005]	Sammlung
pBluescript		<i>E. coli</i> Klonierungsvektor	Sammlung
pJoe2955		<i>E. coli</i> Expressionsvektor (<i>prahBAD-malE</i>) von Josef Altenbuchner	Sammlung
pJoe4056.2		<i>E. coli</i> Expressionsvektor (<i>prahBAD-his6-GFP</i>) von Josef Altenbuchner	Sammlung
pRS305		<i>LEU2</i>	Sammlung
pRS316		<i>CEN6 ARS4 URA3</i>	Sammlung
YEplac181		2 μ Plasmid, <i>LEU2</i> Marker	Sammlung
YEplac181-CDC14	YEplac181	<i>CDC14</i> 2μ (A. Toh-e, Universität Tokio)	Sammlung
pWS968	pRS305	<i>KpnI</i> Schnittstelle des Plasmids pRS305 durch Mutagenese ersetzt	Sammlung
pWS978	pWS968	<i>pGAL1-tCYC1-LEU2</i>	Sammlung
pWS1428	pRS316	<i>pTEF-MYC3-tCYC1-URA3</i>	Sammlung

MATERIAL

pWS1634	pJoe2955	<i>prhaBAD-malE-CDC14</i>	Sammlung
pWS1747	pWS978	<i>pGAL1-NET1^{m9}-tCYC1-LEU2</i>	Sammlung
pWS1748	pWS1747	<i>pGAL1-NET1*^{m9}-tCYC1-LEU2</i>	Sammlung
pWS1752	pBluescript	<i>RRN3</i>	diese Arbeit
pWS1765	pWS1428	<i>pTEF-RRN3-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit
pWS1810	pBluescript	<i>NET1 1-341</i>	diese Arbeit
pWS1811	pBluescript	<i>NET1* 1-341</i>	diese Arbeit
pWS1812	pBluescript	<i>TOF2 1-341 (W303)</i>	diese Arbeit
pWS1823	pJoe2955	<i>prhaBAD-malE-NET1 1-341</i>	diese Arbeit
pWS1824	pJoe4056.2	<i>prhaBAD-his6-NET1 1-341</i>	diese Arbeit
pWS1825	pJoe2955	<i>prhaBAD-malE-NET1* 1-341</i>	diese Arbeit
pWS1826	pJoe4056.2	<i>prhaBAD-his6-NET1* 1-341</i>	diese Arbeit
pWS1827	pJoe2955	<i>prhaBAD-malE-TOF2 1-341 (W303)</i>	diese Arbeit
pWS1828	pJoe4056.2	<i>prhaBAD-his6-TOF2 1-341 (W303)</i>	diese Arbeit
pWS1829	pBluescript	<i>TOF2 1-341 (S288C)</i>	diese Arbeit
pWS1830	pJoe2955	<i>prhaBAD-malE-TOF2 1-341 (S288C)</i>	diese Arbeit
pWS1831	pJoe4056.2	<i>prhaBAD-his6-TOF2 1-341 (S288C)</i>	diese Arbeit
pWS2017	pBluescript	<i>his6-TOF2 1-341</i>	diese Arbeit
pWS2018	pWS1634	<i>prhaBAD-malE-CDC14-RBS-his6-TOF2 1-341</i>	diese Arbeit
pWS2025	pBluescript	<i>his6-NET1 1-341</i>	diese Arbeit
pWS2026	pWS1634	<i>prhaBAD-malE-CDC14-RBS-his6-NET1 1-341</i>	diese Arbeit
pWS2149	pBluescript	<i>TOF2^{m13}</i>	diese Arbeit
pWS2150	pBluescript	<i>TOF2 (W303)</i>	diese Arbeit
pWS2151	pBluescript	<i>TOF2 (S288C)</i>	diese Arbeit
pWS2152	pWS978	<i>pGAL1-TOF2^{m13}-tCYC1-LEU2</i>	diese Arbeit
pWS2153	pWS978	<i>pGAL1-TOF2-tCYC1-LEU2 (W303)</i>	diese Arbeit
pWS2154	pWS978	<i>pGAL1-TOF2-tCYC1-LEU2 (S288C)</i>	diese Arbeit

6.12 Oligonukleotide

Tabelle 6.4: Zusammenfassende Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz und Verwendungszweck
WS0462	ATAAGTTTAGAAGAATACCGCTTACAAAAAAGAACT TAAAGACCGGATCCCCGGGTAAATTA fwd-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung der ersten 374 AS von <i>CDC14</i> mittels pFA6-System
WS0463	ATCTCTTAATTACCTTCAATGTTATTTTGC GCAACCCTC TTGTCGAATTCGAGCTCGTTTAAAC rev-Primer für C-terminale Epitopmarkierung der ersten 374 AS von <i>CDC14</i> mittels pFA6-System
WS0821	ATGTGATGTGAGAACTGTATCCTAG rev-Primer im pTEF der pFA6a-Derivate
WS0826	AGTCACATCAAGATCGTTTATGG Primer für die Bestimmung des Paarungstyps, [Huxley <i>et al.</i> 1990]
WS0827	GCACGGAATATGGGACTACTTCG Primer für die Bestimmung des Paarungstyps, α -spezifisch [Huxley <i>et al.</i> 1990]
WS0828	ACTCCACTTCAAGTAAGAGTTTG Primer für die Bestimmung des Paarungstyps, α -spezifisch [Huxley <i>et al.</i> 1990]
WS1062	CCAAACACCTAAATATGTTGAAAGTGATGAAGACGACC AGCGGATCCCCGGGTAAATTA fwd-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>TOF2</i> mittels pFA6-System
WS1063	AAGATATGGTTGAGAGATCCCAACATAATTACTGACAG ACGAATTCGAGCTCGTTTAAAC rev-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>TOF2</i> mittels pFA6-System
WS1079	CGGATGATTCTGATTTCGAGGAACGTGC fwd-Primer zur Überprüfung der Epitopmarkierung von <i>TOF2</i> zusammen mit pWS821
WS1098	ATATCCTTTG CCCTCCTTGG TGTTTGGTTCAAATAAGTA ACGGATCCCCGGGTAAATTA fwd-Primer für die Deletion von <i>TOF2</i> zusammen mit WS1063 mittels pFA6-System
WS1101	CAATAAATACGCCAATCTTTTGCCAC fwd-Primer zur Überprüfung der <i>TOF2</i> -Deletion zusammen mit WS0821
WS1192	GGAGAAGGACTACAAGCGCCGCGGTGGTATAAGAAAA ACGGATCCCCGGGTAAATTA fwd-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>CDC14</i> mittels pFA6-System
WS1193	TATATAAAAATGAAATAAATTATTTCTTGATGGAGCCAC GAATCGAGCTCGTTTAAAC rev-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>CDC14</i> mittels pFA6-System
WS1194	AGAATTTCTTTGAAGCCTAGTGAGGCCATTGGCGGCTTA CGGAC CCCGGGTAAATTA fwd-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung der ersten 356 AS von <i>CDC14</i> mittels pFA6-System
WS1195	TTTTTGTAAGCGGTATTCTTCTAAACTTATTAAGGGATA GAATTCGAGCTCGTTTAAAC rev-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung der ersten 356 AS von <i>CDC14</i>

	mittels pFA6-System
WS1268	CGGGATCCATGATGGCTTTTGAGAATACAAG fwd-Primer für die Amplifikation von <i>RRN3</i> mit einer <i>Bam</i> HI-Schnittstelle vor dem ATG Startcodon
WS1269	CCCAAGCTTTTAGTCATCCGACCCATCACT rev-Primer für die Amplifikation von <i>RRN3</i> mit einer <i>Hind</i> III-Schnittstelle nach dem Stoppcodon
WS1270	GTTGGATCGAAAGTTATAGAGTTTAAAAGAAAAAGAAA TATGGGGCGGATCCCCGGGTTAATTAA fwd-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung der ersten 600 AS von <i>TOF2</i> mittels pFA6-System
WS1271	TGGCGGTTTCCCAGCATTGGCAAAAATATCTTTTAGGGA TCTATTGAATTCGAGCTCGTTTAAAC rev-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung der ersten 600 AS von <i>TOF2</i> mittels pFA6-System
WS1272	ATTTCGTTTGATTTCGATTGATACCGACTTCCAATTGAGC ACTACTCGGATCCCCGGGTTAATTAA fwd-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung der ersten 341 AS von <i>TOF2</i> mittels pFA6-System
WS1273	AGAGGGGTTAGAATATTGTATATGCATATCAGAATTAG TATGAGAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC rev-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung der ersten 341 AS von <i>TOF2</i> mittels pFA6-System
WS1274	AATAAATCAAGAGTATCAACGCCGCTAATGAACGAAAT TCTACC GCGGATCCCCGGGTTAATTAA fwd-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung der ersten 233 AS von <i>TOF2</i> mittels pFA6-System
WS1275	CATGGGACACTTTTCTTTATTCAGTGCATCATACTTGCT TGCAAG GAATTCGAGCTCGTTTAAAC rev-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung der ersten 233 AS von <i>TOF2</i> mittels pFA6-System
WS1294	CTATATCAAATAAAGATACAATGCATC fwd-Primer zur Überprüfung der C-terminalen Verkürzungen von <i>TOF2</i> zusammen mit pWS821
WS1299	CGGGATCCATGATAAAAATGTGGAGGTTAC fwd-Primer zur Amplifikation der ersten 341 AS von <i>TOF2</i> mit einer <i>Bam</i> HI-Schnittstelle vor dem ATG Startcodon
WS1300	GCAAGCTTTTAAGTAGTGCTCAATTGGAAGTC rev-Primer zur Amplifikation der ersten 341 AS von <i>TOF2</i> mit einer <i>Hind</i> III-Schnittstelle nach dem Stoppcodon
WS1301	CCGCTGCAGGGTCTCGGATCCATGTACAAGCTACAAGT GGTC fwd-Primer zur Amplifikation der ersten 341 AS von NET1 mit <i>Pst</i> I <i>Bsa</i> I <i>Bam</i> HI-Schnittstellen vor dem ATG Startcodon
WS1302	GCAAGCTTTTATGTGCCACCATTAGCAAATG rev-Primer zur Amplifikation der ersten 341 AS von NET1 mit einer <i>Hind</i> III-Schnittstelle nach dem Stoppcodon
WS1314	CTAAAGGGAGGGCAGAGCTCGAAACTTGAAACGCGTAA AACGGATCCCCGGGTTAATTAA fwd-Primer für die Deletion von <i>TOP1</i> mittels pFA6-System
WS1315	GAATGTATTTGCTTCTCCCCTATGCTGCGTTTCTTTGCGG AATTCGAGCTCGTTTAAAC

	rev-Primer für die Deletion von <i>TOP1</i> mittels pFA6-System
WS1316	CGCAATATTCTTTTTTGTCTCTC fwd-Primer für die Überprüfung der <i>TOP1</i> Deletion zusammen mit pWS821
WS1354	GCACAGAGGCTGGGACTACAAAGTACGCTTATAAAAAA AAAAAAAAAATGTGCAGGTCGACAACCCTTATT fwd-Primer für die N-terminale Epitopmarkierung von <i>CDC14</i> mittels pOM-System
WS1355	CTGCCTCGCAGGAAGCTCGATCGTGTGTCGAGGTATACA CTCCTACGGCGGCCGCATAGGCCACT rev-Primer für die N-terminale Epitopmarkierung von <i>CDC14</i> mittels pOM-System
WS1356	GAATGTACTTTTAGCACCATAAG fwd-Primer für die Überprüfung der N-terminalen Epitopmarkierung von <i>CDC14</i>
WS1357	GAATTGTGATTTTCGAAATCCGC rev-Primer für die Überprüfung der N-terminalen Epitopmarkierung von <i>CDC14</i>
WS1358	GCCTGAAACAGAGAGAAGTCGATTACTGTACACCGTGC CTCCT TCTATGTGCAGGTCGACAACCCTTATT fwd-Primer für die N-terminale Epitopmarkierung von <i>NET1</i> mittels pOM-System
WS1359	GCGTTGGAGGCGGCAAAAAGGATCTTTCACCAATGTCT TCGTCTTCGCGGCCGCATAGGCCACT rev-Primer für die N-terminale Epitopmarkierung von <i>NET1</i> ohne die ersten 233 AS mittels pOM-System zusammen mit WS1358
WS1360	GTGGTTACGGGTGGTTTCTTATTAATGTCCTGAGCAGTG ACAGCAGCGCGGCCGCATAGGCCACT rev-Primer für die N-terminale Epitopmarkierung von <i>NET1</i> ohne die ersten 341 AS mittels pOM-System zusammen mit WS1358
WS1361	GTTTTGAACTTTTTTCTTTTC fwd-Primer für die Überprüfung der N-terminalen Epitopmarkierung von <i>NET1</i>
WS1362	GAGATTTCTTTTCCACTATAG rev-Primer für die Überprüfung der N-terminalen Epitopmarkierung von <i>NET1</i>
WS1363	CGTCGCCTGAAGACTCGGAGGCACCAAGACCACTTGTA GCTTGTAGCGGCCGCATAGGCCACT rev-Primer für die N-terminale Epitopmarkierung von <i>NET1</i> mittels pOM-System zusammen mit WS1358
WS1364	CTTATAATATCCTTTGCCCTCCTTGGTGTGTTGGTTCAAAT AAGTAAATGTGCAGGTCGACAACCCTTATT fwd-Primer für die N-terminale Epitopmarkierung von <i>TOF2</i> mittels pOM-System
WS1365	GAGCACTTGGCGGCACCAGTACAATCTGTAACCTCCACA TTTTTATGCGGCCGCATAGGCCACT rev-Primer für die N-terminale Epitopmarkierung von <i>TOF2</i> mittels pOM-System zusammen mit WS1364
WS1366	GCATGGGACACTTTTCTTTATTCAGTGCATCATACTTGC TTGCAAGGCGGCCGCATAGGCCACT rev-Primer für die N-terminale Epitopmarkierung von <i>TOF2</i> ohne die ersten 233 AS mittels pOM-System zusammen mit WS1364
WS1367	CTAGAGGGGTTAGAATATTGTATATGCATATCAGAATTA GTATGAGAGCGGCCGCATAGGCCACT rev-Primer für die N-terminale Epitopmarkierung von <i>TOF2</i> ohne die ersten 342 AS mittels pOM-System zusammen mit WS1364

WS1368	GATGGTCCTAATTGTTTGTGTTG fwd-Primer für die Überprüfung der N-terminalen Epitopmarkierung von <i>TOF2</i>
WS1369	CGAAGTAGATGACGCAGCACC rev-Primer für die Überprüfung der N-terminalen Epitopmarkierung von <i>TOF2</i>
WS1370	GACAAGCTTAAGAAGGAGATATACATATGACCAT fwd-Primer für Amplifikation von Inserts aus pJOE4056 mit <i>HindIII</i> -Site zur bicistronischen Proteinexpression in <i>E.coli</i> über pJOE2955 Derivate
WS1413	GCCACTAGTATGATAAAAATGTGGAGGTTACAG fwd-Primer zur Amplifikation von <i>TOF2</i> ^{m13} mit genomischer DNA aus W4542 mit einer <i>SpeI</i> Schnittstelle vor dem ATG Startcodon
WS1414	GGCCTCGAGCAATAAGAGCGACCTCATACTATAC rev-Primer zur Amplifikation von <i>TOF2</i> ^{m13} mit genomischer DNA aus W4542 mit einer <i>XhoI</i> Schnittstelle hinter dem Stoppcodon
WS1425	CCAAAAGTACCACGATTAAAAACATAGATATCTTAAAC AGAACTCGGATCCCCGGGTAAATTAA fwd-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>SMC4</i> mittels pFA6-System
WS1426	GATATTACAATCAGCAAGTGCTCTTGAATTGATTATTGT ACTAGGAATTCGAGCTCGTTTAAAC rev-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>SMC4</i> mittels pFA6-System
WS1430	GGCCTCGAG TTA CTGGTCGTCTTCATCACTTTC rev-Primer zur Amplifikation von <i>TOF2</i> mit einer <i>XhoI</i> Schnittstelle hinter dem Stoppcodon zusammen mit WS1413
WS1435	GATTACTATGGGTGGAAATGCTG fwd-Primer für die Überprüfung der C-terminalen Epitopmarkierung von <i>SMC4</i> zusammen mit pWS821

7. METHODEN

7.1 Arbeiten mit Bakterien

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurde der *E. coli*-Stamm DH5 α verwendet und zur heterologen Expression von Hefeproteinen der Überexpressionsstamm BL21Codon+ (Stratagen).

7.1.1 Kultivierung von Bakterien in Flüssigmedium

Übernachtskulturen der *E. coli*-Stämme DH5 α und BL21Codon+ wurden in LB-Medium bei 37°C auf dem Schüttler bzw. im Roller über Nacht kultiviert. Zur Selektion auf Plasmide wurde das entsprechende antibiotikahaltige LB-Medium verwendet. Zusätzliche Kultivierungsschritte waren bei der heterologen Proteinexpression in dem *E. coli* Stamm BL21Codon+ notwendig (Kapitel 7.1.3, Kapitel 7.1.4).

7.1.2 Transformation von elektrokompetenten *E. coli* Zellen

Die hierzu gewählte Methode war die Elektroporation. Sie beruht auf der Grundlage, dass durch Anlegen einer hohen Spannung die Zellwände elektrokompetenter Zellen für die Aufnahme von Fremd-DNA durchlässig gemacht werden können [Dower *et al.* 1988].

7.1.2.1 Herstellung elektrokompetenter Zellen

2x 750 ml TB-Medium wurden mit jeweils 40 OD₆₀₀ einer frischen DH5 α Übernachtskultur angeimpft und bei 25°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-1,5 geschüttelt. Die Zellen wurden anschließend 15 min auf Eis abgekühlt und in sterilen GSA-Bechern bei 4°C und 3000 Umdrehungen pro Minute (Upm) geerntet. Danach erfolgte ein zweimaliges Waschen mit 150 ml sterilem, eiskaltem ddH₂O. Nach den Waschschritten wurde das Zellpellet in 30 ml sterilem 10%-igem glycerinsäurefreiem Glycerin aufgenommen und in sterile Falconröhrchen überführt. Die Zellen wurden dann 10 min bei 3000 Upm zentrifugiert und das Pellet in 2 ml 10%-igem Glycerin resuspendiert. 50 μ l Aliquots wurden auf Trockeneis eingefroren und bei -70°C aufbewahrt.

7.1.2.2 Elektroporation

50 µl einer elektrokompenten Bakteriensuspension wurden langsam auf Eis aufgetaut und mit 1-10 µl Plasmid-DNA in eine gekühlte Elektroporationsküvette pipetiert. Die DNA musste vor der Elektroporation gegen Wasser dialysiert werden, um störende Salze zu entfernen. Die Elektroporation erfolgte bei einem Widerstand von 200 Ω, einer Spannung von 2,5 kV und einer Kapazität von 25 µF. Anschließend wurde sofort 1 ml leicht vorgewärmtes SOC-Medium zu der Bakteriensuspension gegeben und die Zellen wurden dann für 1 h bei 37°C gerollert, um die Expression des Resistenzgens zu ermöglichen. Nach der Inkubation bei 37°C erfolgte das Ausplattieren des Elektroporationsansatzes in verschiedenen Verdünnungen auf selektive LB-Platten (Inkubation bei 37°C über Nacht).

7.1.3 Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli*

Zur Expression von *mbpCDC14*, *mbpNET1 1-341*, *mbpNET1* 1-341* und *mbpTOF2 1-341* wurde der Überexpressionsstamm BL21Codon+ verwendet. Der ORF von *CDC14* und die Verkürzungen von *NET1 1-341*, *NET1* 1-341* und *TOF2 1-341* wurden mittels PCR amplifiziert, wobei für *CDC14* das Plasmid YEPlac181-*CDC14* (A. Toh-e, Universität Tokio) als DNA-Matrize diente, für *NET1 1-341* genomische DNA aus K699 und für *TOF2 1-341* genomische DNA aus Wildtyp Stämmen des Stammhintergrunds W303 (K699) oder S288C (BY4741). Für die Amplifikation von *mbpNET1* 1-341* diente pWS1748 (*NET1*^{m9}*) als DNA-Matrize. Anschließend wurden *CDC14* und *TOF2 1-341* *Bam*HI/*Hind*III in pBluescript kloniert, um diese sequenzieren zu lassen und danach in pJoe2955 (*prhaBAD-malE*) [Wiese *et al.* 2001]. Sequenzanalysen von *TOF2 1-341* und dem unverkürzten *TOF2* aus S288C ergaben drei Aminosäureunterschiede zur Sequenz von *TOF2* aus dem Stammhintergrund W303 (D306N, P457L und Y532H). Experimentell konnten jedoch keine Unterschiede zwischen *TOF2* aus S288C und W303 festgestellt werden. Die Restriktionsschnittstellen zur Klonierung wurden über die jeweiligen Primer, die zur Amplifikation der Gene benutzt wurden, eingeführt. Da sich im N-terminalen Teil von *NET1* eine *Bam*HI Schnittstelle befindet, wurde für das *NET1 1-341* bzw. *NET1* 1-341* Fragment *Bsa*I verwendet, um eine *Bam*HI Restriktionsschnittstelle zu generieren, so dass dieses Fragment ebenfalls *Bam*HI/*Hind*III, wie oben im Text beschrieben, in pJoe2955 kloniert werden konnte. Die Klonierungsschritte ergaben die folgenden Plasmide: pWS1634 (*prhaBAD-malE-CDC14*), pWS1823 (*prhaBAD-malE-NET1 1-341*), pWS1825 (*prhaBAD-malE-NET1* 1-341*) und pWS1827 (*prhaBAD-malE-TOF2 1-341*).

Die Proteinexpression wurde zunächst in kleinem Maßstab durchgeführt, um die Bedingungen für eine erfolgreiche Expression auszutesten. Übernachtskulturen des Überexpressionsstamms BL21Codon+, der mit den oben aufgeführten Plasmid-konstrukten transformiert worden war, wurden auf eine OD₆₀₀ von 0,1/ml in LB-Amp/Camp Medium verdünnt und nach 2 h Wachstum bei 20°C mit Rhamnose (0,2%) induziert. Die Proteinexpression erfolgte bei 20°C über Nacht. Als Kontrolle diente ein BL21Codon+ Stamm, der mit dem Vektor pJoe2955 transformiert worden war. Nach erfolgter Induktion wurde das Zellmaterial geerntet (10 OD, 5 min, 5000 Upm). Aliquots der in mbp-Puffer aufgenommenen Zellpellets wurden mit 2x Lämmli-puffer aufgeköcht und über SDS-PAGE und Färbung der SDS-Gele (Kapitel 7.5.3, Kapitel 7.5.4) analysiert.

In größerem Maßstab wurden 600 ml LB-Amp/Camp aus Übernachtskulturen der entsprechenden Stämme beimpft (0,1 OD₆₀₀/ml). Die Induktion der Proteinexpression erfolgte wie oben beschrieben. Die Expressionskulturen wurden geerntet (100 ml Portionen) und zum Zellaufschluss in der French Press in mbp-Puffer aufgenommen.

7.1.4 Coexpression rekombinanter Proteine in *E.coli*

Zur Coexpression von *mbpCDC14* mit *his6NET1 1-341* oder *his6TOF2 1-341* in BL21 Codon+ wurden die Fragmente *NET1 1-341* und *TOF2 1-341* amplifiziert und *Bam*HI/*Hind*III in pJoe4056.2 (*prhaBAD-his6*) kloniert (siehe Klonierung in pJoe2955, Kapitel 7.1.3). Dies ergab die Plasmide pWS1824 (*prhaBAD-his6-NET1 1-341*) und pWS1828 (*prhaBAD-his6-TOF2 1-341* W303 Hintergrund). Diese dienten als DNA-Matrize zur Amplifikation von *his6NET1 1-341* oder *his6TOF2 1-341*. Diese Konstrukte wurden *Hind*III in pBluescript zur Sequenzierung kloniert und anschließend in pWS1634 (Restriktionsschnittstelle und Shine-Dalgarno-Sequenz in den Primern zur Amplifikation enthalten). Daraus konnten folgende Plasmide erhalten werden: pWS2026 (*prhaBAD-malE-CDC14-RBS-his6-NET1 1-341*) und pWS2018 (*prhaBAD-malE-CDC14-RBS-his6-TOF2 1-341*). Diese wurden in BL21 Codon+ transformiert und die Proteinexpression durch die Zugabe von Rhamnose (0,2%) in das Medium induziert (20°C, über Nacht).

7.2 Arbeiten mit Hefe

7.2.1 Kultivierung von Hefestämmen in Flüssigmedium

Für die Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* in Suspensionskultur wurde XY-Vollmedium verwendet. Als Kohlenstoffquelle diente 2% Glucose. Die Inkubation von Vorkulturen erfolgte über Nacht oder über Tag bei 25°C für temperatursensitive Mutanten, nicht temperatursensitive Mutanten konnten bei 30°C kultiviert werden. Aus diesen Vorkulturen wurden dann die Hauptkulturen so angeimpft, dass am nächsten Tag eine wachsende Kultur mit einer OD₆₀₀ um 0,5 vorlag. Die Hauptkulturen wurden über Nacht auf dem Wasserbadschüttler bei 25°C kultiviert.

Für Induktionsexperimente, innerhalb derer Gene unter der Kontrolle des Galaktose Promotors exprimiert werden sollten, erfolgte die Anzucht der Kulturen in XY-Vollmedium mit 2% Raffinose als Kohlenstoffquelle. Die Induktion erfolgte mit 2% Galaktose für circa 3-4 h (25°C).

Mittels der Reagenzien Nocodazol und Hydroxyharnstoff kann ein Arrest der Zellen im Teilungszyklus herbeigeführt werden. Die Zugabe von Nocodazol (7,5 µg/ml Endkonzentration) zum Medium führt aufgrund der Depolymerisation der Mikrotubuli zu einem Arrest innerhalb der Metaphase, während Hydroxharnstoff (0,1 M Endkonzentration), ein Ribonukleotid-Reduktase-Inhibitor, zu einem Arrest in der S-Phase führt.

7.2.2 Synchronisation von Hefestämmen

Es gibt mehrer Möglichkeiten synchrone Kulturen zu erhalten. Innerhalb dieser Arbeit wurden Hefestämme mittels zentrifugaler Elutriation und über die Deletion des Gens *CDC20* und anschließender Wiederherstellung der Funktion dieses Gens synchronisiert.

7.2.2.1 Elutriation

Die zentrifugale Elutriation beruht auf der Grundlage, Hefezellen unterschiedlicher Größe und Morphologie mechanisch zu trennen. Der Elutriator ist eine Durchflußzentrifuge, bei der sich die konzentrierte Zellsuspension in einer Kammer befindet und sich im Schwerkraftfeld entlang eines Gradienten auftrennt. Durch die Regulation der Flußgeschwindigkeit des Mediums durch die Kammer entgegengesetzt zur Zentrifugalkraft wird der Gradient ausgebildet. Auf diese Weise sammeln sich kleine G1 Zellen am Ausgang der Kammer und können durch Erhöhung der Durchflußgeschwindigkeit des Mediums von der restlichen Kultur abgetrennt werden.

Für die Elutriation wurden ca. 6500 OD₆₀₀ Zellen geerntet (GSA, 10 min, 5000 Upm, 4°C), in 65 ml kaltem H₂O resuspendiert und durch Ultraschall (5 Pulse zu 1 sec) getrennt. Anschließend wurde diese Zellsuspension in die Elutriationskammer (3750 Upm, 4°C) gepumpt und das Fließgleichgewicht über die Pumpgeschwindigkeit so eingestellt, dass die Zellen noch nicht in der Lage waren die Kammer zu verlassen. Um die G1-Zellen aus der Kammer zu spülen, wurde die Pumpgeschwindigkeit langsam erhöht. Das Elutrat wurde in Fraktionen gesammelt und mikroskopisch überprüft. Die gesammelten Fraktionen wurden abzentrifugiert (GSA, 10 min, 5000 Upm, 4°C) und in kaltem XY-Medium ohne Kohlenstoffquelle vereinigt. Zum Start des Versuchs wurde der gewünschte Zucker zum Medium gegeben (2% Endkonzentration). Die Kultivierung erfolgte bei der entsprechenden Temperatur.

7.2.2.2 Synchronisation durch die Deletion von *CDC20*

Stämme mit dem Genotyp *cdc20-Δ ade::pGALL-CDC20-tCYC1-ADE* können in galktosehaltigem Medium kultiviert werden, da unter diesen Bedingungen die Expression von *CDC20* ermöglicht wird. Cdc20 ist ein wichtiger Regulator des Metaphase-Anaphase Übergangs. Durch die APC/Cdc20-vermittelte Ubiquitinierung und Degradation des Hefe Securins (Pds1) am Ende der Metaphase wird die Protease Eps1 aktiviert, die durch den Abbau der Cohesinuntereinheit Scc1 die Trennung der Schwester-Chromatiden einleitet. Wird die Transkription von *CDC20* durch die Kultivierung in glucosehaltigem Medium unterdrückt, arretieren die Zellen in der Metaphase. Ein erneutes Wachstum in galktosehaltigem Medium führt zu einer Rekonstitution von *CDC20*, was es den Zellen ermöglicht wieder in den Zellteilungszyklus einzutreten. Hefestämme können somit nach dem Arrest in der Metaphase synchron in die Anaphase hineinlaufen.

Exponentiell wachsende Hefestämme (*cdc20-Δ ade::pGALL-CDC20-tCYC1-ADE*) in Medium mit Raffinose und Galaktose (je 2%, 25°C) wurden geerntet (2 min, 2000 Upm), gewaschen und in neues Medium mit Glucose (2%) überführt für 2,5-3 h bei 25°C. Der Metaphase Arrest wurde mikroskopisch überprüft. Daraufhin wurden die Kulturen erneut geerntet (2 min, 2000 Upm), gewaschen und in Medium mit Raffinose und Galaktose (je 2%, 25°C) umgesetzt, so dass ein Fortschreiten im Zellzyklus möglich war.

7.2.3 Aufbewahrung von Hefestämmen

Hefestämme wurden für einige Wochen in Form von Kolonien auf Agarplatten mit Parafilm versiegelt bei 4°C aufbewahrt.

Für eine dauerhafte Konservierung wurden Glycerindauerkulturen angefertigt. Dazu wurden 2 ml einer Übernachtskultur geerntet, in 1 ml 15%-iges Glycerin aufgenommen und bei -70°C gelagert.

7.2.4 Kreuzung haploider Hefestämme

Zwei haploide Hefestämme unterschiedlichen Paarungstyps können miteinander gekreuzt werden, wobei ein diploider Stamm entsteht. Auf diploide Zellen kann dann selektiert werden, wenn die beiden haploiden Ausgangsstämme unterschiedliche Selektionsmarker (Auxotrophiemarker oder Antibiotikaresistenzen) tragen.

Zur Kreuzung wurde etwas Zellmaterial zweier haploider Stämme auf einer XY-D Platte miteinander vermischt und die Platte bei 25°C/30°C mindestens 5-6 h inkubiert. Dieser Ansatz wurde dann zur Selektion auf diploide Zellen auf die entsprechende Selektionsplatte ausplattiert und erneut inkubiert. Mit den herangewachsenen diploiden Einzelkolonien konnten dann weitergearbeitet werden.

Gab es die Möglichkeit der Selektion auf diploide Zellen nicht, wurden die zu kreuzenden Stämme auf eine Vollmediumsplatte aufgebracht und einzelne Zellen mit Hilfe des Mikromanipulators nebeneinander gelegt (Inkubation über Nacht, 25°C). Um sicherzustellen, dass es sich um diploide Zellen handelte, wurden Einzelausstriche gemacht und einzelne Kolonien mittels PCR auf deren Paarungs-Typ untersucht (7.4.11.1) bzw. auf deren Fähigkeit zur Sporulation (7.2.5).

Zudem konnte die Kreuzung zweier haploider Stämme zur Bestimmung des Paarungstyps einer der beiden Stämme herangezogen werden.

Dazu wurde der Stamm, dessen Paarungstyp bestimmt werden sollte, mit zwei Stämmen gekreuzt, von denen bekannt war, dass der eine den Paarungstyp *MATa* und der andere den Paarungstyp *MATα* aufwies. Die Kreuzung und Selektion auf Diploide erfolgte wie oben beschrieben.

7.2.5 Sporulation diploider Hefestämme und Tetradenanalyse

Unter Mangelbedingungen können diploide Zellen aus dem Zellzyklus austreten und eine Meiose durchlaufen. Dabei entstehen 4 haploide Sporen, die von einem Ascus umschlossen sind und als Tetrade bezeichnet werden. Mit Hilfe der Sporulation können haploide Stämme erzeugt werden, die über bestimmte Eigenschaften des diploiden Stamms verfügen.

Diploide Zellen wurden in 2 ml nährstoffreichem Prä-Sporulationsmedium angeimpft und über Nacht bei 25°C auf dem Roller inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen in

1 ml nährstoffarmem Sporulationsmedium gewaschen, in 2 ml Sporulationsmedium aufgenommen und für 2-3 Tage bei 25°C gerollert. Die Überprüfung der Sporulation erfolgte mikroskopisch.

Mit Hilfe des Mikromanipulators konnten die Sporen der entstandenen Tetraden vereinzelt werden. Dazu musste zunächst der Sporulationsansatz mit Novozymmedium im Verhältnis 1:1 behandelt werden, um den Ascus zu verdauen. Der Verdau erfolgte bei Raumtemperatur für 20 min. Anschließend wurde ein Aliquot der verdauten Sporensuspension auf eine XY-D Platte getropft und die vier zusammenhängenden Sporen einer Tetrade mit dem Mikromanipulator vereinzelt. Nach Inkubation der Platte bei 25°C/30°C entstanden nach 2-4 Tagen Kolonien aus haploiden Zellen. Diese wurden auf Selektionsplatten aufgebracht, um auf die gewünschten Marker zu selektieren.

7.2.6 Hefetransformation nach der Lithiumacetat-Methode

Hefezellen können nach der Behandlung mit Alkaliionen DNA aufnehmen. Hier fand eine von Gietz *et al.* 1992 beschriebene Methode Verwendung. Dazu wurde Lithiumacetat zur Behandlung der Hefezellen eingesetzt, um diese für die DNA-Aufnahme kompetent zu machen.

Aus Übernachtskulturen der zu transformierenden Hefestämme wurden 20 ml XY-D Medium 1:20 angeimpft und für 3-4 h bei 25/30°C geschüttelt. Es wurden pro Transformationsansatz ca. 1×10^7 (1 OD_{600}) Zellen geerntet. Diese wurden zunächst mit 1,5 ml ddH₂O gewaschen, anschließend mit 1 ml TE/LiAc und dann in 50 µl TE/LiAc aufgenommen.

Der Transformationsansatz wurde folgendermaßen pipettiert:

50 µl Zellen in TE/LiAc

5 µl Lachsspermien-DNA (10 mg/ml, 5 min aufgekocht zur Denaturierung)

1-10 µl der zu transformierenden DNA

300 µl 40% PEG in 1x TE/LiAc

Nach Fertigstellung wurde er 20 min bei Raumtemperatur gerollert und anschließend 15 min bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt. Danach wurden die Zellen kurz abzentrifugiert, in 150 µl sterilem ddH₂O aufgenommen und auf entsprechende Selektivplatten ausplattiert, die ca. 2-4 Tage inkubiert wurden, bis Transformanden zu sehen waren. Im Falle der Selektionsmarker Nourseothricin oder Kanamycin wurden die transformierten Stämme nach dem Hitzeschock in Vollmedium ohne Antibiotikum bei 25°C für 3 weitere Stunden inkubiert, um die Ausbildung der Resistenz zu gewährleisten bevor sie in ddH₂O aufgenommen und auf die entsprechenden Selektivplatten ausplattiert wurden.

7.2.7 Integration von Genen in das Hefegenom

Die Integration eines Gens in das Hefegenom beruht auf homologer Rekombination. Durch diesen Austauschprozess homologen Genmaterials kann eine veränderte Version eines Gens an seinem ursprünglichen Genort integriert werden. Epitopmarkierungen von Genen oder Gendeletionen können durch die integrative Transformationstechnik durchgeführt werden. Die N- und C-terminale Epitopmarkierung sowie die Deletion von Genen wurde wie in Longtine *et al.* 1998 und Gauss *et al.* 2005 beschrieben durchgeführt (Kapitel 7.4.13).

Integrative Plasmide wurden für eine erfolgreiche Integration ins Hefegenom zunächst durch den Verdau mit einer entsprechenden Restriktionsendonuklease linearisiert, da nur dann eine homologe Rekombination mit einer hohen Effizienz erfolgen konnte. Anschließend wurde die Hefetransformation durchgeführt wie in Kapitel 7.2.6 beschrieben.

Darüber hinaus gibt es noch die Möglichkeit Gene über ARS/CEN Plasmide, die eine autonom replizierende Sequenz und ein Zentromer besitzen oder über 2 μ Plasmide, die sich von einem natürlich vorkommenden Hefepiasmid ableiten, über Transformation in *S. cerevisiae* einzuführen. In diesem Zusammenhang kommt es jedoch nicht zu einer Integration über homologe Rekombination.

7.2.8 Wachstumstest von Hefestämmen über Verdünnungsreihen

Dieser Test diente dazu, das Wachstumsverhalten von Hefestämmen unter diversen Bedingungen wie unterschiedlichen Temperaturen oder unterschiedlichen Medien zu verfolgen.

Frische Übernachtskulturen der zu testenden Stämme wurden in einer Mikrotiterplatte mit Wasser auf eine OD₆₀₀ von 1,0 (ca. 1×10^7) verdünnt, woraus fünf weitere 1:10 Verdünnungen hergestellt wurden. Diese Verdünnungsreihen wurden dann mit Hilfe eines so genannten Froggers (ein Stempel mit 48 gleichmäßig abgeschnittenen Metallstiften) auf die entsprechenden Platten aufgebracht und unter den zu testenden Bedingungen inkubiert, bis eventuell phänotypische Unterschiede sichtbar wurden.

7.3 Färbung und Mikroskopie von Hefezellen

7.3.1 Fixierung von Hefezellen mit Ethanol

Für mikroskopische Untersuchungen und Analyse der Hefezellen mittels Durchflußzytometrie wurden diese in 70% Ethanol fixiert. Diese mit Ethanol fixierten Zellen können für einen längeren Zeitraum bei 4°C aufbewahrt werden.

Wachsende Hefezellen einer Übernachtskultur wurden geerntet, in 150 µl ddH₂O aufgenommen und durch langsame Zugabe von 350 µl 100%-igem Ethanol fixiert. Die Lagerung der Proben erfolgte bei 4°C. Da die Zellen bei der Fixierung mit Ethanol agglomerieren, wurden sie vor deren Analyse in Natriumcitratpuffer (50mM, pH 7,0) gewaschen, aufgenommen und mit Ultraschall behandelt (3-4 kurze Pulse, 1s), um Zellaggregate zu zerstören und die Zellen zu vereinzeln.

7.3.2 Fixierung von Hefezellen mit Formaldehyd

Eine Inkubation von Hefezellen in formaldehydhaltigem Medium führt zur Fixierung der Zellen durch Quervernetzung der Proteine. Auf diese Weise fixierte Zellen eignen sich für verschiedene Färbungen wie z.B. indirekte Immunfluoreszenz.

Zur Fixierungen wurden 4,4 ml der jeweiligen Kultur mit 610 µl Formaldehyd versehen und je nach zu untersuchendem Protein für eine bestimmte Zeit (20 min-1 h) bei Raumtemperatur gerollert. Danach wurde das Zellmaterial abzentrifugiert, mit Puffer B (500 µl-1 ml) gewaschen und anschließend in 1 ml Puffer B aufgenommen. Eine Lagerung der formaldehydfixierten Zellen ist bis zu sieben Tagen bei 4°C möglich.

Für Fixierungszeiten unter 10 Minuten wurde eine exponentiell wachsende Kultur (4,4 ml) abzentrifugiert und das Zellpellet in 440 µl Kaliumphosphatpuffer (0,1 M; pH 6,5) mit Sorbitol (1M) und Formaldehyd (3,7%) aufgenommen [Kilmartin *et al.* 1993]. Die Fixierung erfolgte bei Raumtemperatur für 2-5 Minuten. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, in den Kaliumphosphatpuffer (0,1 M; pH 6,5) mit Sorbitol (1M) aufgenommen und bei 4°C gelagert.

7.3.3 Färbung von Hefezellen mit DAPI

Der Farbstoff DAPI (4', 6'-Diamidino-2-phenylindol) bindet spezifisch an DNA und zeigt eine blaue Fluoreszenz, wenn er mit UV-Licht der Wellenlänge 350 nm angeregt wird. Auf diese Weise können DNA-haltige Organelle wie Zellkern und Mitochondrien sichtbar gemacht werden.

Zur DAPI-Färbung wurden ethanolfixierte Hefezellen (Kapitel 7.3.1) mit 1 ml 50 mM Natriumcitrat (pH 7,0) gewaschen, in 500 µl 50 mM Natriumcitrat aufgenommen und mit fünf kurzen Ultraschallpulsen zur Auflösung von Zellaggregaten behandelt. Von dieser Zellsuspension wurden dann 5 µl auf einem Objektträger ausgestrichen und nach kurzem Antrocknen mit 1 µl DAPI-Reagenz in Mounting Medium überschichtet. Eine Analyse des Präparats konnte anschließend mit dem Fluoreszenzmikroskop (Axio Imager, Zeiss) durchgeführt werden.

7.3.4 Färbung der Zellen mit ConA-FITC

Über Concanavalin A (ConA)-FITC können Zellwandbereiche angefärbt werden. Concanavalin A gehört zu den Lektinen. Es bindet Kohlenhydrate insbesondere α -D-Glucose und ähnliche Zucker.

Für mikroskopische Analysen wurden ethanolfixierte Zellen mit 1 ml PBS gewaschen, in 200 µl PBS aufgenommen und mit 3-4 kurzen Ultraschallpulsen zur Auflösung von Zellaggregaten behandelt. Zu dieser Zellsuspension wurde anschließend ConA-FITC gegeben (60 µg/ml) [Lew & Reed 1993] und für 10-20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut ultraschallbehandelt und dann auf einen Objektträger aufgebracht (ca. 5 µl). Nach kurzem Antrocknen wurden die Zellen mit DAPI-Reagenz (1:100) in Mounting Medium überschichtet. Eine Analyse des Präparats konnte anschließend mit dem Fluoreszenzmikroskop (Axio Imager, Zeiss) durchgeführt werden.

7.3.5 Indirekte Immunfluoreszenz und Mikroskopie

Eine Methode zur Lokalisierung von Proteinen ist die Immunfluoreszenz [Pringle *et al.* 1991]. Mittels proteinspezifischer bzw. epitopspezifischer primärer Antikörper und fluoreszenzmarkierter sekundärer Antikörper kann die Lokalisation von Proteinen in formaldehydfixierten Zellen (Kapitel 7.3.2) im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.

7.3.5.1 Beschichtungen der Objektträger mit Polylysin

Auf die verwendeten Multiwell Objektträger wurden pro *well* 10 µl Polylysine (MW > 300.000 1 mg/ml) aufgebracht und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die *wells* 4x 5 min mit 45 µl Wasser gewaschen und getrocknet. In diesem Zustand können die Objektträger staubfrei bei 4°C gelagert werden.

7.3.5.2 Vorbereitung der Proben für die indirekte Immunfluoreszenz

Formaldehyd fixierte Zellen wurden in 1 ml Puffer B/Kaliumphosphatpuffer (0,1 M; pH 6,5) mit Sorbitol (1M) auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt. Zum Verdau der Zellwand dieser Zellen wurden sie mit 20 µl Zymolyase (1 mg/ml in Wasser) und 25 µl DTT (1M) bei 37°C ca. 15 min inkubiert, um die intrazellulären Proteine für den Antikörper zugänglich zu machen. Die verdauten Zellen wurden dann kurz abzentrifugiert (2 min, 2000 Upm) in Puffer B/Kaliumphosphatpuffer (0,1 M; pH 6,5) mit Sorbitol (1M) gewaschen und anschließend in 500 µl der erwähnten Puffer aufgenommen und auf 12-well Objektträger, die zuvor mit Polylysin (Kapitel 7.3.5.1) behandelt worden waren, aufgebracht (ca. 40 µl verdautes Zellmaterial pro well). Nachdem die Zellen angetrocknet waren, wurden sie 6 min in -20°C kaltes Methanol und dann 30 sec in -20°C kaltes Aceton getaucht, um die Zellen an den Objektträger zu fixieren. Anschließend wurden die Zellen mit 45 µl PBS/BSA (1 mg/ml) geblockt und über Nacht mit dem entsprechenden primären Antikörper in der jeweiligen Verdünnung in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach der Inkubation über Nacht wurden die Zellen mit PBS/BSA gewaschen (45 µl, 5x 5min) und danach mit dem entsprechenden sekundären Antikörper in einer feuchten Kammer im Dunkeln für 2 h inkubiert. Nach erneutem Waschen der Zellen (5x 5min) wurden diese mit dem DAPI-Reagenz, das 1:100 in aushärtendem Mounting Medium verdünnt worden war, überschichtet und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Nach ca. 2 h war das Mounting Medium angetrocknet und die Fluoreszenz konnte mit dem Fluoreszenzmikroskop (Axio Imager, Zeiss) untersucht werden. Je nach den jeweils verwendeten sekundären Antikörpern α -Alexa488 oder α -Alexa546, wurde die Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 495 nm oder 556 nm angeregt. Zur Dokumentation wurden mit der an dem Mikroskop angebrachten Kamera (AxioCam MRm) Bilder gemacht.

7.3.6 Durchflußzytometrie

Zur Bestimmung des DNA-Gehalts von Hefezellen wurde die Durchflußzytometrie eingesetzt [Haase & Lew 1997].

Ethanolfixierte Zellen (Kapitel 7.3.1) wurden mit 1 ml 50 mM Natriumcitrat (pH 7,0) gewaschen, in 50 mM Natriumcitrat aufgenommen und mit Ultraschall behandelt (3-4 kurze Pulse). Anschließend wurde die OD₆₀₀ des Zellmaterials bestimmt und auf 1 OD₆₀₀/ml eingestellt. 250 µl der Zellsuspension wurden zunächst mit 15 µl RNase A (10 mg/ml) versetzt und für 1 h bei 50°C geschüttelt. Dann erfolgte die Inkubation des Ansatzes mit 15 µl Proteinase K (10 mg/ml) für 1 h bei 50°C unter Schütteln. Nach kurzem Abkühlen wurden die

Zellen abzentrifugiert und in 250 µl 50 mM Natriumcitrat mit 1 µM Sytox Green über Nacht bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Zur Messung des DNA-Gehalts mit dem Partec CA-III wurden 5-20 µl der Proben in 2 ml 50 mM Tris/HCl pH 7,5 verdünnt. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mit dem Programm WinMDI.

7.4 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

7.4.1 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Restriktionsendonukleasen vom Typ II sind bakterielle Enzyme, die doppelsträngige DNA innerhalb einer spezifischen Erkennungssequenz durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen schneiden. Abhängig vom Enzym entstehen dabei lineare, doppelsträngige DNA-Fragmente mit 5'- oder 3'-Überhängen bzw. glatten Enden.

Für den Reaktionsansatz wurde ein für das Enzym spezifischer Puffer verwendet, der vom Hersteller mitgeliefert worden ist. Bei einem Doppelverdau musste darauf geachtet werden, dass ein Puffer verwendet wurde, der für beide Enzyme die optimalen Bedingungen aufwies.

Reaktionsansätze setzten sich folgendermaßen zusammen:

0,5-1 µg DNA

1-10 U Restriktionsenduklease

10x Reaktionspuffer

Zugabe von ddH₂O zum Auffüllen auf das 10fache Volumen des zugegebenen 10x Puffers.

Die Inkubation erfolgte mindestens 1 h bei der vom Hersteller vorgegebenen Temperatur. Je nach Angabe fand eine Hitzeinaktivierung (65°C, 20 min) statt.

7.4.2 Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese ist eine einfache und effektive Methode, um DNA Fragmente voneinander zu trennen und deren Größe zu bestimmen. Sie beruht auf der Grundlage, dass mit zunehmender Länge der DNA Fragmente ihre Beweglichkeit im Agarosegel bei einer angelegten Spannung abnimmt und so eine größen-spezifische Auftrennung erfolgen kann. Die aufgetrennten DNA Banden können durch die Färbung mit Ethidiumbromid, das sich reversibel in die Basenabfolge der DNA einlagert und bei Bestrahlung mit UV-Licht fluoresziert, sichtbar gemacht werden.

Meist wurden 0,7%-ige Agarosegele hergestellt (0,5 g Agarose ultra pure in 70 ml 1x TAE Puffer mit 70 µl Ethidiumbromid 0,5 mg/ml), wobei die Agarosekonzentration in

Abhängigkeit von den jeweiligen Längen der aufzutrennenden Fragmenten gewählt werden kann. Als Laufpuffer diente 1x TAE. Die Proben wurden vor dem Auftrag auf das Gel mit 10x Laufpuffer (1:10) versetzt, um die Dichte der DNA zu erhöhen, so dass diese in die Taschen des Gels absinken konnte. Außerdem konnte durch den im Laufpuffer enthaltenen Referenzfarbstoff der Elektrophoreseverlauf besser verfolgt werden. Zur Abschätzung der DNA-Fragmentlänge wurde zusätzlich ein Größenstandard mit aufgetragen (GeneRuler™ DNA-Längenstandard, Fermentas). Der Gellauf erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80 V für 30-60 min. War die DNA genügend weit gelaufen konnten die Banden auf dem UV-Leuchttisch sichtbar gemacht werden. Zur Dokumentation wurde das Bandenmuster fotografiert.

7.4.3 DNA-Elution aus Agarosegelen

Um aus einem Gemisch von DNA-Fragmenten, das durch einen Restriktionsverdau erhalten wurde, das gewünschte Fragment zu isolieren, wurde zunächst eine Agarosegel-Elektrophorese und anschließend eine Extraktion des jeweiligen Fragments mit Hilfe des QIAquick® Gel Extraction Kit durchgeführt.

Das Prinzip dieses Kits beruht auf der Adsorption der DNA an eine Silica-Gel Membran bei hohen Salzkonzentrationen, während bei niedrigen Salzkonzentrationen die gebundene DNA wieder eluiert werden kann. Die Gelelution erfolgte nach Anweisungen des QIAquick® Gel Extraction Protokolls, wobei die DNA mit 30-50 µl ddH₂O eluiert wurde.

7.4.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von linearisiertem Vektor und Insert wird die T4-DNA-Ligase, die die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyenden doppelsträngiger DNA katalysiert, eingesetzt. Vor einer Ligation ist darauf zu achten, dass Vektor-DNA, die nur mit einem Restriktionsenzym geschnitten wurde, dephosphoryliert wird (Shrimp Alkaline Phosphatase), um eine Religation des Vektors zu vermeiden.

Zur Ligation zweier DNA-Fragmente, wurde das Insertfragment in einem 4-6 fachen Überschuss zu dem Vektor gegeben. Die Konzentrationen von Vektor und Insert wurden dabei mittels Agarosegel-Elektrophorese abgeschätzt. Die Ligation erfolgte mit der T4-DNA-Ligase in einem Volumen von 20 µl. Der pH-Wert und die entsprechende Ionenstärke wurden durch den 10x Ligasepuffer eingestellt, der zudem noch ATP enthält, das als energieliefernder Cofaktor der T4-DNA-Ligase dient. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur.

7.4.5 Plasmidpräparation nach der Kochlysatmethode für Plasmide mit hoher Kopienzahl (high copy)

Mit dieser Methode nach Berghammer & Auer 1993 ist eine schnelle Präparation von Plasmiden, die in hoher Kopienzahl vorliegen, aus *E. coli* möglich. Die erhaltene Plasmid-DNA ist noch mit Protein und bakterieller DNA verunreinigt, kann jedoch problemlos für einfache Klonierungen, Restriktionsanalysen und Hefetransformationen eingesetzt werden.

2 ml einer *E. coli* Übernachtskultur wurden in einem 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß für 4 min bei 14.000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 40 µl Easy-Prep Puffer resuspendiert, für 1 min im Heizblock gekocht, 1 min auf Eis abgekühlt und 15 min bei 14.000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand enthielt die Plasmid-DNA und konnte für weitere Zwecke eingesetzt werden.

7.4.6 Plasmidpräparation durch alkalische Lyse für Plasmide mit niedriger Kopienzahl (low copy)

Diese Technik nutzt das unterschiedliche Verhalten von Plasmid-DNA und chromosomaler DNA in einem alkalischen pH-Bereich. DNA denaturiert bei stark alkalischem pH. Nach Neutralisierung hybridisieren die beiden Stränge der Plasmid-DNA rasch wieder, während die weit größere chromosomale DNA einzelsträngig verbleibt und ausfällt.

3 ml einer *E. coli* Übernachtskultur wurden abzentrifugiert in 100 µl Puffer F1 resuspendiert, in 150 µl Puffer F2 lysiert und anschließend mit 150 µl 3 M Kaliumacetat neutralisiert (pH 5,0). Dieser Ansatz wurde für 10 min auf Eis inkubiert und danach abzentrifugiert (10 min, 14.000 Upm). Der Überstand (ca. 350 µl) wurde in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und die DNA einer Ethanolfällung unterzogen (Zugabe von 750 µl 100%-igem Ethanol, 10 min zu -70°C, 10 min zentrifugieren bei 14.000 Upm). Das trockene Pellet wurde nach der Entfernung des Ethanols in 50 µl 1x TE aufgenommen.

7.4.7 Plasmidpräparation mit dem JETSPIN Kit im größeren Maßstab

Zur Isolation von großen und hochreinen Mengen an Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde der JETSPIN Kit der Firma Genomed verwendet. Die Plasmidpräparation mittels dieses Kits beruht auf der alkalischen Lyse der Zellen, Isopropanolfällung der DNA und anschließenden Reinigung über eine JETSPIN Zentrifugationssäule.

Verwendet wurden die Lösungen aus dem JETSPIN Kit der Firma Genomed. Die Plasmidpräparation wurde unter Anleitung des JETSPIN Protokolls durchgeführt.

7.4.8 Bestimmung von Konzentration und Reinheit einer DNA-Lösung

Die Konzentration der DNA wurde photometrisch durch die Messung der Extinktion (E) bei 260 nm bestimmt ($c \text{ [}\mu\text{g/ml]} = OD_{260} \times V \times F$ wobei V = Verdünnungsfaktor, F = Multiplikationsfaktor: 50 für ds DNA). Zur Bestimmung der Reinheit der DNA-Lösung diente der Quotient aus der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm.

7.4.9 Gesamt-DNA Präparation aus *S. cerevisiae*

Diese Methode zur Isolierung genomischer DNA aus Hefe beruht auf einer mechanischen Zerstörung der Zellwände, anschließender Zelllyse durch Detergenzbehandlung und alkoholischer Fällung der DNA [Cryer *et al.* 1975, Fujimura & Sakuma 1993]. Die auf diese Weise isolierte DNA kann für PCR-Amplifikation bestimmter DNA-Fragmente eingesetzt werden.

5 ml einer dicht gewachsenen Übernachtskultur wurden abzentrifugiert, mit 1 ml ddH₂O gewaschen und in 100 µl Tris/EDTA/SDS (Tris/HCl pH 7,5 50 mM; EDTA 20 mM; SDS 10 mg/ml) aufgenommen. Dann wurden Glasperlen bis knapp unter den Meniskus der Zellsuspension zugegeben und es erfolgte der Aufschluss der Zellen in der Retschmühle (5 min). Zu den Zelltrümmern wurden 500 µl Tris/EDTA/SDS gegeben und für 10 min bei 70°C inkubiert. Danach wurden 200 µl Kaliumacetat zugesetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Darauf erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 14.000 Upm. Der in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführte Überstand wurde mit 1 ml 100%-igem Ethanol versetzt. Die auf diese Weise ausgefällte DNA wurde kurz abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet für 10 min getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 300 µl 1x TE resuspendiert und mit 50 µl RNase A (1 mg/ml) für 30 min bei 65°C behandelt. Daraufhin wurde durch Zugabe von 500 µl 100%-igem Isopropanol die DNA erneut gefällt und abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70%-igem Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in 50 µl 1x TE gelöst.

7.4.10 Die Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der PCR-Technik (*polymerase chain reaction*) ist es möglich, spezifische DNA-Sequenzen *in vitro* zu amplifizieren [Mullis *et al.* 1992].

Man geht so vor, dass man die DNA mit der zu amplifizierenden Sequenz mit einem Überschuss von zwei chemisch synthetisierten Oligonukleotiden (Primer) reagieren lässt. Dazu muss der DNA Doppelstrang zunächst einmal denaturiert werden. Der Denaturierungsschritt wird bei 94°C durchgeführt. Anschließend wird die Temperatur auf

45°C-65°C gesenkt, so dass die Hybridisierung der Primer an die einzelsträngige Ziel-DNA stattfinden kann. Man spricht von Annealing. Für den nun folgenden Elongationsschritt wird neben einer thermostabilen DNA Polymerase noch ein Mix aus den vier Desoxyribonukleosid-Triphosphaten benötigt. Innerhalb dieses Schrittes wird die Temperatur auf 72°C erhöht, bei der eine Verlängerung der Primer am 3'-Ende erfolgt bis wieder ein doppelsträngiger Nucleinsäurestrang vorliegt. Die Dauer der Elongationszeit hängt von der Länge des zu amplifizierenden Fragments ab und liegt bei 1 min/kb für die *Taq*-Polymerase. Bei Wiederholung der Reaktionsfolge aus Denaturierung, Annealing und Elongation kommt es nach jedem Reaktionsschritt zu einer Verdopplung der eingesetzten DNA und damit in einer Kettenreaktion zu einer exponentiellen, selektiven Anreicherung der durch die Oligonukleotidprimer flankierten DNA-Sequenz. Die amplifizierten DNA-Fragmente sind nach gelelektrophoretischer Auftrennung des Reaktionsgemisches, als Banden vor dem Hintergrund der nicht amplifizierten DNA zu erkennen.

Diese Methode kann vielfältig angewendet werden. So lassen sich gezielte Mutationen und Deletionen in DNA-Fragmente einführen bzw. die vorgenommenen Veränderungen überprüfen. Desweiteren können PCR-vermittelte Epitopmarkierungen vorgenommen und Gene unter die Kontrolle verschiedener Promotoren gesetzt werden. Auch ist es möglich, über PCR spezifische Restriktionsschnittstellen zu generieren.

Standard PCR-Ansatz (50µl):

template DNA	x µl
Forward-Primer (10 pmol/µl)	3 µl
Reverse-Primer (10 pmol/µl)	3 µl
10x PCR-Puffer	5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	2 µl
dNTP-Mix (2 mM)	5 µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl

Temperaturprofil:

Erste Denaturierung	94°C	4 min	
Denaturierung	94°C	45 sec	} 10-30 Zyklen
Annealing	56°C	45 sec	
Elongation	72°C	1 min/kb	
Abschließende Elongation	72°C	5-10 min	

7.4.11 Kolonie-PCR

Neben dem Einsatz von isolierter DNA aus Hefezellen (Kapitel 7.4.9) zum Nachweis von Manipulationen, die an spezifischen Hefegenen über PCR vorgenommen wurden oder zur Bestimmung des Paarungstyps von Hefe, gibt es die Methode der Kolonie-PCR [Amberg *et al.* 2005]. Als DNA-Matrize dient der Überstand von in SDS aufgeschlossenen Hefezellen des zu untersuchenden Stamms [Akada *et al.* 2000]. Dazu wurde eine geringe Menge an Hefezellen von einer Kolonie in 20 µl 0,25 % SDS resuspendiert, kurz gevortext, für ca. 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und für 1 min abzentrifugiert. Der Überstand konnte für eine Kolonie-PCR verwendet werden. Alternativ dazu gab es die Möglichkeit etwas von dem zu untersuchenden Zellmaterial in Kolonie-Puffer (0,125 M Tris/HCl pH 8,5; 0,56 M KCl) zu resuspendieren, wovon 2,5 µl für die PCR eingesetzt wurden.

7.4.11.1 Kolonie-PCR zur Bestimmung des Paarungstyps [Huxley *et al.* 1990]

Die PCR Reaktion setzte sich folgendermaßen zusammen (25 µl Ansatz):

Überstand der aufgeschlossenen Hefezellen	0,5 µl
Primer Mix (WS826, WS827, WS828; 10 pmol/µl)	3 µl
dNTPs (2 mM)	2,5 µl
10x PCR-Puffer + MgCl ₂ (15 mM)	2,5 µl
Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,15 µl
ddH ₂ O	ad 25 µl

Folgendes Temperaturprofil wurde eingesetzt:

Erste Denaturierung	94°C	4 min	
Denaturierung	94°C	1 min	} 35 Zyklen
Annealing	55°C	1 min	
Elongation	72°C	40 sec	
Abschließende Elongation	72°C	3 min	

War die PCR-Reaktion abgeschlossen, wurden 10-15 µl des Reaktionsprodukts gelelektrophoretisch aufgetrennt. Konnte eine Bande bei 404 bp nachgewiesen werden, so hatte der Stamm den Paarungstyp *MATα*. War eine Bande der Größe 544 bp zu verzeichnen, handelte es sich um ein *MATa* Stamm. Traten beide Banden auf, lag ein diploider Stamm vor.

7.4.12 PCR zur Amplifikation von Genen

Um Gene aus dem Hefegenom zu amplifizieren und sie in Plasmide zu klonieren, wurde die KOD-Polymerase verwendet. Die dazu eingesetzten Oligonukleotidprimer enthielten neben der für das zu amplifizierende Gen komplementären Sequenz zusätzliche Restriktionsschnittstellen für die Klonierung in den dafür vorgesehenen Vektor.

PCR-Ansatz (50 µl):

template DNA	1 µl
Forward-Primer (10 pmol/µl)	3 µl
Reverse-Primer (10 pmol/µl)	3 µl
10x PCR-Puffer	5 µl
MgSO ₄ (25 mM)	6 µl
dNTP-Mix (2 mM)	5 µl
KOD-Polymerase (1 U/µl)	1 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl

Temperaturprofil:

Erste Denaturierung	94°C	3 min	
Denaturierung	94°C	30 sec	} 25 Zyklen
Annealing	56°C	30 sec	
Elongation	68°C	1 min/kb	
Abschließende Elongation	68°C	10 min	

7.4.13 PCR zur Genommanipulation [Longtine *et al.* 1998, Gauss *et al.* 2005]

Um Proteine mit einem Epitop zu markieren oder Gene bzw. Teile eines Gens zu deletieren, wurde zur Manipulation des C-terminalen Teils eines Gens das pFA6a-System von Longtine *et al.* 1998 verwendet bzw. das pOM-System von Gauss *et al.* 2005, um N-terminale Veränderungen eines Gens ins Hefegenom einzuführen. Hierzu wurden die Primer so konstruiert, dass sie jeweils am 5'-Ende ein Stück aus 40-45 bp homolog zu der Sequenz des zu manipulierenden Gens enthielten und am 3'-Ende 20 bp homolog zu der zu amplifizierenden Sequenz des pFA6a- oder pOM-Plasmids. Von dem erhaltenen PCR-Produkt wurden 10 µl direkt in Hefe transformiert. Eine erfolgreiche Manipulation konnte ebenfalls mittels PCR verifiziert werden (Kapitel 7.4.11). Zur Manipulation des N-Terminus von Genen nach Gauss *et al.* 2005 wurden diploide Stämme mit dem erhaltenen PCR-Produkt transformiert. Dies ist vor allem von Bedeutung, wenn der N-terminale Teil eines essentiellen Gens manipuliert werden soll, da hinter den Promotor des zu verändernden Gens nicht nur die gewünschte Manipulation sondern auch ein Markergen integriert wird, um eine Selektion positiver Transformanten zu gewährleisten. Daher ist nach dieser ersten Transformationsrunde zunächst keine Transkription des manipulierten Gens möglich. Konnte eine erfolgreiche Integration über PCR nachgewiesen werden, erfolgte eine weitere Transformation positiver Stämme mit einem ARS/CEN-Plasmid, das für die Cre-Rekombinase codiert. Mit Hilfe der Cre-Rekombinase rekombiniert das Markergen, das von loxP Sequenzen flankiert wird, aus dem Genom hinaus. Mittels Tetradenanalyse konnten anschließend die gewünschten Stämme erhalten werden.

PCR-Ansatz (50 µl):

Plasmid-DNA	1 µl
Forward-Primer (10 pmol/µl)	3 µl
Reverse-Primer (10 pmol/µl)	3 µl
10x PCR-Puffer	5 µl

MgSO ₄ (25 mM)	6 µl
dNTP-Mix (2 mM)	5 µl
KOD-Polymerase (1 U/µl)	1 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl

Temperaturprofil:

Erste Denaturierung	94°C	4 min	
Denaturierung	94°C	1 min	} 25 Zyklen
Annealing	56°C	1 min	
Elongation	72°C	1 min/kb	
Abschließende Elongation	72°C	10 min	

7.4.14 PCR-Amplifikation zur Bestimmung der Integrationszahl

Wird ein Gen an einem Marker Locus innerhalb des Hefegenoms integriert, kann dieses auch in multiplen Kopien vorliegen. Durch geschickt gewählte Primer war es möglich eine Mehrfachintegration über PCR nachzuweisen.

In Abbildung 7.1 findet sich eine schematische Darstellung dieser PCR. Bei einer einfachen Integration ist nur die Kombination der Primerpaare P1 und P2 in der Lage für die Amplifikation des Produkts A zu sorgen. Bei mehrfacher Integration entsteht neben dem Produkt A auch das Produkt B ausgehend von den Primern P2 und P3.

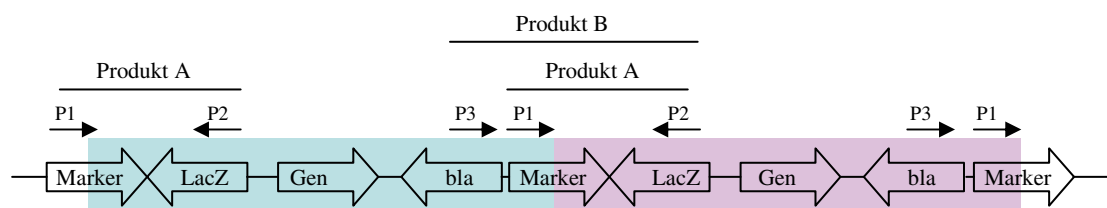


Abbildung 7.1: Schematische Darstellung der PCR zur Integrationszahlbestimmung [nach Wegerer 2004]

Dargestellt sind die Gene im entsprechenden Bereich des Chromosoms, an dem die Integration stattfindet. Der integrierte Teil ist jeweils farblich gekennzeichnet. Zusätzlich sind die Bindestellen der Primer P1, P2 und P3 gekennzeichnet. Bei einer Einfachintegration führen nur die Primer P1 und P2 zu einer Amplifikation, Produkt A entsteht. Handelt es sich um eine Mehrfachintegration entsteht neben Produkt A das etwas größere Produkt B ausgehend von dem Primerpaar P2/P3.

PCR-Ansatz 1 (50 µl):

genom. DNA (1:20)	1 µl
Primer 1 (10 pmol/µl)	5 µl

PCR-Ansatz 2 (50 µl):

genom. DNA (1:20)	1 µl
Primer 3 (10 pmol/µl)	5 µl

Primer 2 (10 pmol/μl)	5 μl	Primer 2 (10 pmol/μl)	5 μl
10x PCR-Puffer	5 μl	10x PCR-Puffer	5 μl
+ MgCl ₂ (15 mM)		MgSO ₄ (25 mM)	6 μl
dNTP-Mix (2 mM)	5 μl	dNTP-Mix (2 mM)	5 μl
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/μl)	0,3 μl	KOD-Polymerase (1U/μl)	0,5 μl
ddH ₂ O	ad 50 μl	ddH ₂ O	ad 50 μl

Temperaturprofil:

Erste Denaturierung	94°C	4 min	
Denaturierung	94°C	1 min	} 25-35 Zyklen
Annealing	56°C	30 sec	
Elongation	72°C	1 min/kb	
Abschließende Elongation	72°C	10 min	

7.5 Proteinbiochemische Arbeitsmethoden

7.5.1 Herstellung von Zelllysaten aus *E.coli*

Zum Aufschluss größerer Kulturansätze wurde die French Press verwendet. Nach dem Aufschluss wurde ein Aliquot der Probe mit 2x Lämmli-puffer versetzt und 10 min im Heizblock aufgeköcht. Dieses Aliquot wurde für weitere Analysen über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Färbung der SDS-Gele mit dem Färbemittel RAPID Stain™ verwendet (Kapitel 7.5.3, Kapitel 7.5.4).

7.5.2 Herstellung von Proteinrohextrakten aus Hefezellen

Zur Herstellung von Proteinextrakten aus Hefe wurde ein mechanisches Aufschlussverfahren durchgeführt.

Dazu wurden mindestens 5×10^7 Zellen einer wachsenden Hefekultur geerntet (2000 Upm, 2 min), mit 1 ml kaltem ddH₂O gewaschen, in 200 μl Puffer 3 mit β-Glycerolphosphat aufgenommen und in ein Schraubdeckeleppendorf Reaktionsgefäß mit 0,3 g Glasperlen (0,45-0,5 mm) überführt. Die Probe wurde unverzüglich auf Trockeneis eingefroren und konnte bis zur weiteren Verarbeitung bei -70°C gelagert werden. Der Aufschluss erfolgte bei 4°C in der Retschmühle für 5 min bei maximaler Energie. Durch Zentrifugation (3 min, 14.000 Upm) wurden die Zelltrümmer pelletiert und ein Aliquot des Überstands für Analyse über SDS-

PAGE und Western-Blot mit 2x Lämmli-Puffer in einem Verhältnis 1:1 versetzt und 6 min im Heizblock aufgekocht. Weitere 5 µl des Überstands wurden mit Wasser 1:1000 verdünnt, 1:1 mit Bradford-Reagenz versetzt und für die Bradford-Proteinbestimmung herangezogen. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung.

7.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Über die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt werden, wobei kleinere Proteine die poröse Polyacrylamidmatrix schneller durchlaufen [Lämmli 1970]. Dabei wird mit denaturierenden Bedingungen gearbeitet. Durch SDS und β -Mercaptoethanol wird die Sekundärstruktur der Proteine zerstört und eine Protein-Protein Wechselwirkung unterbunden. Eine Bindung von SDS an Proteine führt zu negativ geladenen SDS-Protein Komplexen mit konstantem Ladungs-zu-Masse-Verhältnis. Die SDS-Protein Komplexe verschiedener Proteine unterscheiden sich nur noch in ihrer Größe und haben vergleichbare hydrodynamische Eigenschaften. Zunächst werden die Proteine im großporigen, ladungsarmen Sammelgel auf eine Bande konzentriert und anschließend im engmaschigen, ladungsreichen Trenngel aufgetrennt. Der Anteil von Acrylamid im Trenngel (7-12%) kann je nach Größe und Modifikation der zu untersuchenden Proteine gewählt werden.

Nach Polymerisation des Gels und Aufbau der Gelapparatur wurde pro Spur ca. 30 µg des Gesamtzellextrakts aufgetragen und die Elektrophorese mit 20-30 mA pro Gel durchgeführt. War die blaue Front aus dem Gel gewandert bzw. an der untersten Gelkante angelangt, wurde die Elektrophorese gestoppt und das Trenngel konnte für einen Western-Blot (7.5.5) oder für eine Färbung mit dem Färbemittel RAPID Stain™ (7.5.4) eingesetzt werden.

7.5.4 Färbung von SDS-Gelen

Um Proteine nach ihrer elektrophoretischen Auftrennung zu detektieren, wurde das Trenngel nach 3x-igem Waschen mit ddH₂O für 1 h mit dem kommerziell erhältlichen Färbemittel RAPID Stain™ bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Gel durch mehrmaliges Waschen mit ddH₂O entfärbt bis ein sichtbares Proteinbandenmuster erkennbar war. Zur Dokumentation wurde das Gel fotografiert und anschließend im Gelrockner 2 h getrocknet.

7.5.5 Western-Blot und immunologischer Nachweis von Proteinen

Ein Western-Blot dient zur Übertragung von Proteinen aus einem SDS-Gel auf eine Nitrocellulosemembran [Towbin *et al.* 1992]. Die auf die Membran geblotteten Proteine können über einen immunologischen Nachweis detektiert werden. Dazu wird die Membran zunächst mit einem primären Antikörper inkubiert, der spezifisch das Protein oder die Epitopmarkierung, mit der das Protein versehen ist, erkennt. Der Nachweis des ersten Antikörpers erfolgt dann mit einem sekundären gegen den ersten gerichteten Antikörper, der gekoppelt an ein Enzym vorliegt. Im Falle des Enzyms Horse Radish Peroxidase (HRP) erfolgt die Nachweisreaktion durch die Oxidation von Luminol, das dabei Licht der Wellenlänge 420 nm emittiert, was mit einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden kann.

Zum Transfer der Proteine vom SDS-Gel auf die Membran wurde zunächst ein in Transferpuffer getränkter Whatman Filter auf die Graphitanode der Elektroblothingapparatur gelegt. Darauf folgte die gewässerte und dann in Transferpuffer getränkte Nitrocellulosemembran, das ebenfalls in Transferpuffer getränkte Trenngel und abschließend ein weiterer mit Transferpuffer getränkter Whatman Filter. Nach Auflegen der Kathode wurden die Proteine vom Gel auf die Membran übertragen (45 min bei 160 mA pro Gel oder 70 min bei 40 mA pro Gel). Die anschließende Färbung der Membran mit Ponceau S diente zur Dokumentation der aufgetragenen Proteinmengen. Außerdem werden die Proteine durch den Eisessig in der Färbelösung auf dem Blot fixiert. Vor der Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper musste diese in 5% Milchpulverlösung (Milchpulver in TBS-T) für ca. 1 h geblockt werden, um unspezifische Proteinbindungsstellen der Membran abzusättigen. Die Behandlung der Membran mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C auf einer Wippe, wobei der Antikörper in der entsprechenden Verdünnung in 5 % Milchpulverlösung zugegeben wurde. Bevor am nächsten Tag der sekundäre Antikörper zugegeben werden konnte, musste die Membran zunächst gewaschen werden (3x 5 min in TBS-T), um Reste des primären Antikörpers zu beseitigen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper in der entsprechenden Verdünnung in 5% Milchpulverlösung für circa 2 h bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen (3x 5 min in TBS-T) wurde die Membran in TBS gegeben und sofort die Nachweisreaktion der HRP durchgeführt. Dazu wurde die Chemiluminescence Blotting Substrat Lösung (Roche, 10 µl Reagenz A und 990 µl Reagenz B) gleichmäßig auf der Membran verteilt. In einem abgedunkelten Raum erfolgte die Entwicklung der entstandenen Proteinbanden, die als Schwärzung auf einem Röntgenfilm zu erkennen waren.

7.5.6 Immunpräzipitation/Coimmunpräzipitation

Die **Immunpräzipitation (IP)** kann zu einer Ausfällung gewünschter Proteine aus einem Proteinrohextrakt herangezogen werden [Harlow & Lane 1998]. Dabei macht man sich die hohe Affinität von spezifischen Antikörpern zu ihrem Antigen, gegen das sie erzeugt wurden, zu nutze. Ein Gesamtzellextrakt aus Hefe, der das gewünschte Protein enthält, wird zunächst mit einem Antikörper gegen das jeweilige Protein oder gegen eine Epitopmarkierung des Proteins inkubiert. Der auf diese Weise entstehende Immunkomplex kann mit Protein A aus *Staphylococcus aureus* gebunden an eine Agarose Matrix ausgefällt werden, da Protein A spezifisch die schwere Kette von Antikörpern bindet. Über eine anschließende Western-Blot-Analyse des Präzipitats kann die Interaktion zweier Proteine nachgewiesen werden. Dazu wird die Membran mit einem Antikörper inkubiert, der gegen das Protein bzw. gegen eine Epitopmarkierung dieses Proteins gerichtet ist, dessen Interaktion mit dem präzipitierten Protein nachgewiesen werden soll. Man spricht hierbei von einer **Coimmunpräzipitation (CoIP)**.

Es wurden mindestens 6×10^8 Zellen pro Ansatz auf Glaskügelchen in mehreren Schraubdeckeleppendorf Reaktionsgefäßen geerntet und mit der Retschmühle aufgeschlossen (5 min bei 4°C). Die Zelltrümmer wurden anschließend abzentrifugiert (10 min, 14.000 Upm), die Überstände identischer Ansätze vereinigt und erneut zentrifugiert (15 min, 14.000 Upm), um störende Lipide zu entfernen. Nachdem die Überstände in neue Eppendorf Reaktionsgefäße überführt worden waren, wurden 10-20 µl Aliquouts pro Ansatz mit 2x Lämmli-puffer versetzt und aufgekocht, um das Lysat einer Western-Blot-Analyse unterziehen zu können. Außerdem erfolgte eine Bradford-Proteinbestimmung. Für die Immunpräzipitation wurde jeder Ansatz auf die gleiche Gesamt-Proteinmenge eingestellt (1-3 mg Protein), der entsprechende Antikörper zugegeben (80 µl) und auf ein Endvolumen von 500 µl mit Puffer 3 aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben 2 h bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Zugabe von 40 µl Protein A-Agarose, die vorher 2x mit 1 ml Puffer 3 gewaschen worden waren. Die Ansätze wurden 2 h bei 4°C gerollert. Anschließend wurde das Präzipitat 3x mit 1 ml Puffer 3 gewaschen, wobei nie das gesamte Puffervolumen abgezogen wurde. Erst beim letzten Waschschrift wurde das Präzipitat mit einer Hamiltonspritze trocken gesaugt und in 30 µl Lämmli-puffer aufgenommen (10 min, 100°C). Es folgte die Analyse im Western-Blot mit den entsprechend spezifischen Antikörpern.

7.5.7 Affinitätspräzipitation rekombinanter Proteine

Das Prinzip der Affinitätspräzipitation ist ähnlich dem der Immunpräzipitation. Die Präzipitation des markierten Proteins erfolgt jedoch nicht immunologisch über Antikörper. Proteine, die mit mbp (Maltosebindeprotein, maltose binding protein) fusioniert sind, können über eine Amylose Bindungsmatrix präzipitiert werden. Auf eine Interaktion zweier Proteine kann anschließend in einer SDS-PAGE und/oder Western-Blot-Analyse getestet werden.

Zellpellets induzierter *E. coli* Stämme BL21-Codon+, die mit Plasmidkonstrukten zur Coexpression von ^{mbp}*CDC14* mit ^{his6}*NET1 1-341* bzw. ^{his6}*TOF2 1-341* transformiert worden waren, wurden in mbp-Puffer aufgenommen und über die French Press aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (SS34, 15 min, 15.000 Upm, 4°C) und jeweils 20 µl der Lysate mit 2x Lämmli-Puffer aufgekocht, um diese anschließend über eine SDS-PAGE analysieren zu können. Die restlichen Lysate wurden nach Zugabe von 800 µl der Amylose Bindungsmatrix, die vorher mit mbp-Puffer gewaschen worden waren, 2 h bei 4°C gerollert. Das Amylose Bindungsmaterial wurde dann 4-5x mit 2 ml mbp-Puffer gewaschen und anschließend 20-30 µl des Materials in 20-30 µl Lämmli-Puffer aufgekocht. Danach erfolgte eine Analyse der Lysate und der Präzipitate über SDS-PAGE und Western-Blot mit einem tetra-His Antikörper gegen 6xHistidin, um zu ermitteln, ob ^{his6}Net1 1-341 bzw. ^{his6}Tof2 1-341 mit ^{mbp}Cdc14 copräzipitiert werden konnte.

7.5.8 Affinitätsreinigung rekombinanter Proteine

Die Affinitätsreinigung rekombinanter mbp-Fusionsproteine erfolgte ähnlich der Affinitätspräzipitation. Proteine, die mit mbp fusioniert sind (^{mbp}Cdc14, ^{mbp}Net1 1-341, ^{mbp}Net1* 1-341 und ^{mbp}Tof2 1-341), wurden über eine Amylose Bindungsmatrix präzipitiert (Kapitel 7.5.7). Der Überstand wurde abgenommen und nachdem die Bindungsmatrix 5x mit 2,5 ml mbp-Puffer gewaschen worden war, erfolgte die Elution der gebundenen Proteine über die Zugabe von Maltose 10 mM in mbp-Puffer (30 min, 4°C auf dem Roller). Nach abgeschlossener Inkubation wurde die Bindungsmatrix abzentrifugiert (2 min, 3000 Upm) und der Überstand über Bradford-Messung und SDS-PAGE analysiert.

7.5.9 Messung der Phosphatase Aktivität

Die Aktivität von ^{mbp}Cdc14 wurde mit para-Nitrophenylphosphat (pNPP) als Substrat *in vitro* nach Taylor *et al.* 1997 bestimmt. Para-Nitrophenylphosphat wird nach der Dephosphorylierung in ein gelbes Produkt (para-Nitrophenol) umgewandelt, das photometrisch bestimmt werden kann. Zur Bestimmung der Phosphatase Aktivität wurde

gereinigtes ^{mbp}Cdc14 (5 µg/ml) mit steigenden Mengen von ^{mbp}Net1 1-341, ^{mbp}Net1* 1-341 bzw. ^{mbp}Tof2 1-341 (2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml) versetzt. Die Reaktion wurde nach der Zugabe des chromogenen Substrats (20 mM in Reaktionspuffer) gestartet (30°C, 15 min). Nach dem Abstoppen der Reaktion (0,25 N NaOH) wurde die Aktivität der Phosphatase bei 405 nm gemessen.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Adames NR, Cooper JA (2000). Microtubule interactions with the cell cortex causing nuclear movements in *Saccharomyces cerevisiae*. The Journal of Cell Biology **149** (4): 863-874.
- Amberg DC, Burke D, Strathern JN (2005). Methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Akada R, Murakane T, Nishizawa Y (2000). DNA extraction method for screening yeast clones by PCR. Biotechniques **28** (4): 668-670, 672, 674.
- Alexandru G, Uhlmann F, Mechtler K, Poupert MA, Nasmyth K (2001). Phosphorylation of the cohesin subunit Scc1 by Polo/Cdc5 kinase regulates sister chromatid separation in yeast. Cell **105** (4): 459-472.
- Amon A, Irniger S, Nasmyth K (1994). Closing the cell cycle circle in yeast: G2 cyclin proteolysis initiated at mitosis persists until the activation of G1 cyclins in the next cycle. Cell **77** (7): 1037-1050.
- Asakawa K, Yoshida S, Otake F, Toh-e A (2001). A novel functional domain of Cdc15 kinase is required for its interaction with Tem1 GTPase in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics **157** (4): 1437-1450.
- Azzam R, Chen SL, Shou W, Mah AS, Alexandru G, Nasmyth K, Annan RS, Carr SA, Deshaies RJ (2004). Phosphorylation by cyclin B-Cdk underlies release of mitotic exit activator Cdc14 from the nucleolus. Science **305** (5683): 516-519.
- Bardin AJ, Visintin R, Amon A (2000). A mechanism for coupling exit from mitosis to partitioning of the nucleus. Cell **102** (1): 21-31.
- Beach DL, Thibodeaux J, Maddox P, Yeh E, Bloom K (2000). The role of the proteins Kar9 and Myo2 in orienting the mitotic spindle of budding yeast. Current Biology **10** (23): 1497-1506.
- Bembenek J, Kang J, Kurischko C, Li B, Raab JR, Belanger KD, Luca FC, Yu H (2005). Crm1-mediated nuclear export of Cdc14 is required for the completion of cytokinesis in budding yeast. Cell Cycle **4** (7): 961-971.
- Bembenek J, Yu H (2001). Regulation of the anaphase-promoting complex by the dual specificity phosphatase human Cdc14a. The Journal of Biological Chemistry **276** (51): 48237-48242.
- Berdougo E, Nachury MV, Jackson PK, Jallepalli PV (2008). The nucleolar phosphatase Cdc14B is dispensable for chromosome segregation and mitotic exit in human cells. Cell Cycle **7** (9): 1184-1190.
- Berghammer H, Auer B (1993). "Easy-preps": fast and easy plasmid miniprep for analysis of recombinant clones in *E. coli*. Biotechniques **14** (4): 524, 528.
- Brachmann CB, Davies A, Cost GJ, Caputo E, Li J, Hieter P, Boeke JD (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. Yeast **14** (2): 115-132.
- Buck SW, Sandmeier JJ, Smith JS (2002). RNA polymerase I propagates unidirectional spreading of rDNA silent chromatin. Cell **111** (7): 1003-1014.
- Bücker C (2006). Genetische Untersuchung zur Wechselwirkung des Nukleolusproteins Net1 mit der Zellzyklusphosphatase Cdc14. Diplomarbeit, Institut für Industrielle Genetik, Universität Stuttgart.
- Cardozo T, Pagano M (2004). The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. Nature Reviews Molecular Cell Biology **5** (9): 739-751.

- Carmo-Fonesca M, Mendes-Soares L, Campos I (2000). To be or not to be in the nucleolus. Nature Cell Biology **2** (6): E107-112.
- Cenamor R, Jiménez J, Cid VJ, Nombela C, Sánchez M (1999). The budding yeast Cdc15 localizes to the spindle pole body in a cell-cycle-dependent manner. Molecular Cell Biology Research Communications **2** (3): 178-184.
- Charles JF, Jaspersen SL, Tinker-Kulberg RL, Hwang L, Szidon A, Morgan DO (1998). The Polo-related kinase Cdc5 activates and is destroyed by the mitotic cyclin destruction machinery in *S. cerevisiae*. Current Biology **8** (9): 497-507.
- Chen CT, Peli-Gulli MP, Simanis V, McCollum D (2006). *S. pombe* FEAR protein orthologs are not required for release of Clp1/Flp1 phosphatase from the nucleolus during mitosis. Journal of Cell Science **119** (Pt 21): 4462-4466.
- Clemente-Blanco A, González-Novo A, Machín F, Caballero-Lima, Aragón L, Sánchez M, de Aldana CR, Jiménez J, Correa-Bordes J (2006). The Cdc14p phosphatase affects late cell-cycle events and morphogenesis in *Candida albicans*. Journal of Cell Science **199** (Pt 6): 1130-1143.
- Cohen-Fix O, Koshland D (1997). The metaphase-to-anaphase transition: avoiding a mid-life crisis. Current Opinion in Cell Biology **9** (6): 800-806.
- Cohen-Fix O, Koshland D (1999). Pds1p of budding yeast has dual roles: inhibition of anaphase initiation and regulation of mitotic exit. Genes & Development **13** (15): 1950-1959.
- Collins SR, Miller KM, Maas NL, Roguev A, Fillingham J, Chu CS, Schuldiner M, Gebbia M, Recht J, Shales M, Ding H, Xu H, Han J, Ingvarsdottir K, Cheng B, Andrews B, Boone C, Berger SL, Hieter P, Zhang Z, Brown GW, Ingles CJ, Emili A, Allis CD, Toczyski DP, Weissman JS, Greenblatt JF, Krogan NJ (2007). Functional dissection of protein complexes involved in yeast chromosome biology using a genetic interaction map. Nature **446** (7137): 806-810.
- Costanzo M, Nishikawa JL, Tang X, Millman JS, Schub O, Breitkreuz K, Dewar D, Rupes I, Andrews B, Tyers M (2004). CDK activity antagonizes Whi5, an inhibitor of G1/S transcription in yeast. Cell **117** (7): 899-913.
- Cryer DR, Eccleshall R, Marmur J (1975). Isolation of yeast DNA. Methods in Cell Biology **12**: 39-44.
- Cueille N, Salimova E, Esteban V, Blanco M, Moreno S, Bueno A, Simanis V (2001). Flp1, a fission yeast orthologue of the *S. cerevisiae* CDC14 gene, is not required for cyclin degradation or rum1p stabilisation at the end of mitosis. Journal of Cell Science **114** (Pt14): 2649-2664.
- D'Amours D, Amon A (2004). At the interface between signaling and executing anaphase-Cdc14 and the FEAR network. Genes & Development **18** (21): 2581-2591.
- D'Amours D, Stegmeier F, Amon A (2004). Cdc14 and condensin control the dissolution of cohesin-independent chromosome linkages at repeated DNA. Cell **117** (4): 455-469.
- De Almeida A, Raccurt I, Peyrol S, Charbonneau M (1999). The *Saccharomyces cerevisiae* Cdc14 phosphatase is implicated in the structural organization of the nucleolus. Biology of the Cell **91** (9): 649-663.
- Dolinski K, Balakrishnan R, Christie KR, Costanzo MC, Dwight SS, Engel SR, Fisk DG, Hirschmann JE, Hong EL, Nash R, Oughtred R, Theesfeld CL, Binkley G, Lane C, Schroeder M, Sethuraman A, Dong S, Weng S, Miyasato S, Andrada R, Botstein D, Cherry JM. "Saccharomyces Genome Database". <http://www.yeastgenome.org>
- Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. Nucleic Acids Research **16** (13): 6127-6145.
- Esteban V, Vázquez-Novelle MD, Calvo E, Bueno A, Sacristán MP (2006). Human Cdc14A reverses CDK1 phosphorylation of Cdc25A on serines 115 and 320. Cell Cycle **5** (24): 2894-2898.

- Evan GI, Lewis GK, Ramsay G, Bishop JM (1985). Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. Molecular and Cellular Biology **5** (12): 3610-3616.
- Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. Cell **33** (2): 389-396.
- Field J, Nikawa J, Broek D, MacDonald B, Rodgers L, Wilson IA, Lerner RA, Wigler M (1988). Purification of a RAS-responsive adenylyl cyclase complex from *Saccharomyces cerevisiae* by use of an epitope addition method. Molecular and Cellular Biology **8** (5): 2159-2165.
- Fraschini R, D'Ambrosio C, Venturetti M, Lucchini G, Piatti S (2006). Disappearance of the budding yeast Bub2-Bfa1 complex from the mother-bound spindle pole contributes to mitotic exit. The Journal of Cell Biology **172** (3): 335-346.
- Fujimura H, Sakuma Y (1993). Simplified isolation of chromosomal and plasmid DNA from yeasts. Biotechniques **14** (4): 538-540.
- Gauss R, Trautwein M, Sommer T, Spang A (2005). New modules for the repeated internal and N-terminal epitope tagging of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. **22** (1): 1-12.
- Geil C (2004). Die Rolle der Phosphatase Cdc14 im Zellteilungszyklus und ihre nucleolare Verankerung. Diplomarbeit, Institut für Industrielle Genetik, Universität Stuttgart.
- Geymonat M, Jensen S, Johnston LH (2002). Mitotic exit: the Cdc14 double cross. Current Biology **12** (14): R482-R484.
- Ghaemmaghami S, Huh WK, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, O'Shea EK, Weissman JS (2003). Global analysis of protein expression in yeast. Nature **425** (6959): 737-741.
- Gietz D, St Jean A, Woods RA, Schiestl RH (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. Nucleic Acids Research **20** (6): 1425.
- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG (1996). Life with 6000 genes. Science **274** (5287): 546, 563-567.
- Gottlieb S, Esposito RE (1989). A new role for a yeast transcriptional silencer gene, SIR2, in regulation of recombination in ribosomal DNA. Cell **56** (5): 771-776.
- Granot D, Snyder M (1991). Segregation of the nucleolus during mitosis in budding and fission yeast. Cell Motility and the Cytoskeleton **20** (1): 47-54.
- Gray CH, Good VM, Tonks NK, Barford D (2003). The structure of the cell cycle protein Cdc14 reveals a proline-directed protein phosphatase. The EMBO Journal **22** (14): 3524-3535.
- Grether ME, Herskowitz I (1999). Genetic and biochemical characterization of the yeast spo12 protein. Molecular Biology of the Cell **10** (11): 3689-3703.
- Gruneberg U, Glotzer M, Gartner A, Nigg EA (2002). The CeCDC-14 phosphatase is required for cytokinesis in the *Caenorhabditis elegans* embryo. The Journal of Cell Biology **158** (5): 901-914.
- Gruneberg U, Neef R, Honda R, Nigg EA, Barr FA (2004). Relocation of Aurora B from centromeres to the central spindle at the metaphase to anaphase transition requires MKIp2. The Journal of Cell Biology **166** (2): 167-172.
- Guacci V, Hogan E, Koshland D (1994). Chromosome condensation and sister chromatid pairing in budding yeast. The Journal of Cell Biology **125** (3): 517-530.
- Haase SB, Lew DJ (1997). Flow cytometric analysis of DNA content in budding yeast. Methods in Enzymology **283**: 322-332.

- Hall MC, Jeong DE, Henderson JT, Choi E, Bremmer SC, Iliuk AB, Charbonneau H (2008). Cdc28 and Cdc14 control stability of the anaphase-promoting complex inhibitor Acm1. The Journal of Biological Chemistry **283** (16): 10396-10407.
- Harlow E, Lane D (1998). Using Antibodies. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Harper JW, Burton JL, Solomon MJ (2002). The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more. Genes & Development **16** (17): 2179-2206.
- Hartwell LH (1978). Cell division from a genetic perspective. The Journal of Cell Biology **77** (3): 627-637.
- Hartwell LH, Culotti J, Pringle JR, Reid BJ (1974). Genetic control of the cell division cycle in yeast. Science **183** (120): 46-51.
- Hartwell LH, Weinert TA (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. Science **246** (4930): 629-634.
- Hershko A, Ciechanover A (1998). The ubiquitin system. Annual Review of Biochemistry. **67**:425-479.
- Herskowitz I (1988). Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiological Reviews **52** (4): 536-553.
- Higuchi T, Uhlmann F (2005). Stabilization of microtubule dynamics at anaphase onset promotes chromosome segregation. Nature **433** (7022): 171-176.
- Hu F, Wang Y, Liu D, Li Y, Qin J, Elledge SJ (2001). Regulation of the Bub2/Bfa1 GAP complex by Cdc5 and cell cycle checkpoints. Cell **107** (5): 655-665.
- Huang J, Brito IL, Villén J, Gygi SP, Amon A, Moazed D (2006). Inhibition of homologous recombination by a cohesin-associated clamp complex recruited to the rDNA recombination enhancer. Genes & Development **20** (20): 2887-2901.
- Huang J, Moazed, D (2003). Association of the RENT complex with nontranscribed and coding regions of rDNA and a regional requirement for the replication fork block protein Fob1 in rDNA silencing. Genes & Development **17** (17): 2162-2176.
- Huxley C, Green ED, Dunham I (1990). Rapid assessment of *S. cerevisiae* mating type by PCR. Trends in Genetics **6** (8): 236.
- Jaspersen SL, Charles JF, Morgan DO (1999). Inhibitory phosphorylation of the APC regulator Hct1 is controlled by the kinase Cdc28 and the phosphatase Cdc14. Current Biology **9** (5): 227-236.
- Jaspersen SL, Charles JF, Tinker-Kulberg RL, Morgan DO (1998). A late mitotic regulatory network controlling cyclin destruction in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular Biology of the Cell **9** (10): 2803-2817.
- Jin QW, Ray S, Choi SH, McCollum D (2007). The nucleolar Net1/Cfi1-related protein Dnt1 antagonizes the septation initiation network in fission yeast. Molecular Biology of the Cell **18** (8): 2924-2934.
- Johzuka K, Terasawa M, Ogawa H, Ogawa T, Horiuchi T (2006). Condensin loaded onto the replication fork barrier site in the rRNA gene repeats during S phase in a FOB1-dependent fashion to prevent contraction of a long repetitive array in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and Cellular Biology **26** (6): 2226-2236.
- Jorgensen P, Tyers M (1999). Altered states: programmed proteolysis and the budding yeast cell cycle. Current Opinion in Microbiology **2** (6): 610-617.
- Juang YL, Huang J, Peters JM, McLaughlin ME, Tai CY, Pellman D (1997). APC-mediated proteolysis of Ase1 and the morphogenesis of the mitotic spindle. Science **275** (5304): 1311-1314.
- Kaiser BK, Zimmerman ZA, Charbonneau H, Jackson PK (2002). Disruption of centrosome structure, chromosome segregation, and cytokinesis by misexpression of human Cdc14A phosphatase. Molecular Biology of the Cell **13** (7): 2289-2300.
- Khmelniskii A, Lawrence C, Roostalu J, Schiebel E (2007). Cdc14-regulated midzone assembly controls anaphase B. The Journal of Cell Biology **177** (6):981-993.

- Kilmartin JV, Dyos SL, Kershaw D, Finch JT (1993). A spacer protein in the *Saccharomyces cerevisiae* spindle pole body whose transcript is cell cycle-regulated. The Journal of Cell Biology **123** (5): 1175-1184.
- Kobayashi T, Horiuchi T (1996). A yeast gene product, Fob1 protein, required for both replication fork blocking and recombinational hotspot activities. Genes to Cells **1** (5): 465-474.
- Lavoie BD, Hogan E, Koshland D (2004). In vivo requirements for rDNA chromosome condensation reveal two cell-cycle-regulated pathways for mitotic chromosome folding. Genes & Development **18** (1): 76-87.
- Lämmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227** (5259): 680-685.
- Lee SE, Jensen S, Frenz LM, Johnson AL, Fesquet D, Johnston LH (2001). The Bub2-dependent mitotic pathway in yeast acts every cell cycle and regulates cytokinesis. Journal of Cell Science **114** (Pt 12): 2345-2354.
- Léger-Silvestre I, Trumtel S, Noaillac-Depeyre J, Gas N (1999). Functional compartmentalization of the nucleus in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Chromosoma **108** (2): 103-113.
- Lew DJ, Weinert T, Pringle JR (1997). Cell Cycle control in *Saccharomyces cerevisiae*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Yeast III: 607-695.
- Lew DJ, Reed SI (1993). Morphogenesis in the yeast cell cycle: regulation by Cdc28 and cyclins. The Journal of Cell Biology **120** (6): 1305-1320.
- Li L, Ernsting BR, Wishart MJ, Lohse DL, Dixon JE (1997). A family of putative tumor suppressors is structurally and functionally conserved in humans and yeast. The Journal of Biological Chemistry **272** (47): 29403-29406.
- Liakopoulos D, Kusch J, Grava S, Vogel J, Barral Y (2003). Asymmetric loading of Kar9 onto spindle poles and microtubules ensures proper spindle alignment. Cell **112** (4): 561-574.
- Longtine MS, McKenzie A 3rd, Demarini DJ, Shah NG, Wach A, Brachet A, Philippsen P, Pringle JR (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast **14** (10): 953-961.
- Luca FC, Mody M, Kurischko C, Roof DM, Giddings TH, Winey M (2001). *Saccharomyces cerevisiae* Mop1p is required for cytokinesis and mitotic exit. Molecular and Cellular Biology **21** (20): 6972-6983.
- Machín F, Torres-Rosell J, De Piccoli G, Carballo JA, Cha RS, Jarmuz A, Aragón L (2006). Transcription of ribosomal genes can cause nondisjunction. The Journal of Cell Biology **173** (6): 893-903.
- Machín F, Torres-Rosell J, Jarmuz A, Aragón L (2005). Spindle-independent condensation-mediated segregation of yeast ribosomal DNA in late anaphase. The Journal of Cell Biology **168** (2): 209-219.
- Maekawa H, Schiebel E (2004). Cdk1-Clb4 controls the interaction of astral microtubule plus ends with subdomains of the daughter cell cortex. Genes & Development **18** (14): 1709-1724.
- Maekawa H, Usui T, Knop M, Schiebel E (2003). Yeast Cdk1 translocates to the plus end of cytoplasmatic microtubules to regulate bud cortex interactions. The EMBO Journal **22** (3): 438-449.
- Mah AS, Jang J, Deshaies RJ (2001). Protein kinase Cdc15 activates the Dbf2-Mob1 kinase complex. Proceedings of the National Academy of Science USA **98** (13): 7325-7330.
- Mailand N, Lukas C, Kaiser BK, Jackson PK, Bartek J, Lukas J (2002). Deregulated human Cdc14A phosphatase disrupts centrosome separation and chromosome segregation. Nature Cell Biology **4** (4): 317-322.

- Mendenhall MD, Hodge AE (1998). Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology and Molecular Biology Reviews **62** (4): 1191-1243.
- Menssen R, Neutzner A, Seufert W (2001). Asymmetric spindle pole localization of yeast Cdc15 kinase links mitotic exit and cytokinesis. Current Biology **11** (5):345-350.
- Miller J, Gordon C (2005). The regulation of proteasome degradation by multi-ubiquitin chain binding proteins. FFBS Letters **579** (15): 3224-3230.
- Molk JN, Schuyler SC, Liu JY, Evans JG, Salmon ED, Pellman D, Bloom K (2004). The differential roles of budding yeast Tem1p, Cdc15p, and Bub2p protein dynamics in mitotic exit. Molecular Biology of the Cell **15** (4): 1519-1532.
- Moll T, Tebb G, Surana U, Robitsch H, Nasmyth K (1991). The role of phosphorylation and the CDC28 protein kinase in cell cycle-regulated nuclear import of the *S. cerevisiae* transcription factor SWI5. Cell **66** (4): 743-758.
- Morgan DO (2007). The Cell Cycle. New Science Press Ltd., London
- Morgan DO (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. Annual Reviews of Cell & Developmental Biology **13**: 261-291.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1992). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. Biotechnology **24**: 17-27.
- Nash P, Tang X, Orlicky S, Chen Q, Gertler FB, Mendenhall MD, Sicheri F, Pawson T, Tyers M (2001). Multisite phosphorylation of a CDK inhibitor sets a threshold for the onset of DNA replication. Nature **414** (6863): 514-521.
- Nasmyth K (2001). Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis. Annual Reviews of Genetics **35**: 673-745.
- Nasmyth K (1996). At the heart of the budding yeast cell cycle. Trends in Genetics **12** (10): 405-412.
- Nasmyth K, Adolf G, Lydall D, Seddon A (1990). The identification of a second cell cycle control on the HO promoter in yeast: cell cycle regulation of SWI5 nuclear entry. Cell **62** (4): 631-647.
- Neutzner A (2002). Termination der Mitose: Die Rolle der Phosphatase Cdc14 beim M/G1-Übergang in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Doktorarbeit, Institut für Industrielle Genetik, Universität Stuttgart.
- Neutzner A (1998). Untersuchungen zur Rolle von *CDC14* im Zellteilungszyklus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit, Institut für Industrielle Genetik, Universität Stuttgart.
- Pan X, Ye P, Yuan DS, Wang X, Bader JS, Boeke JD (2006). A DNA integrity network in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Cell **124** (5): 1069-1081.
- Park H, Sternglanz R (1999). Identification and characterization of the genes for two topoisomerase I-interacting proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast **15** (1): 35-41.
- Pellman D, Christman MF (2001). Separase anxiety: dissolving the sister bond and more. Nature Cell Biology **3** (9): E207-E209.
- Pereira G, Höfken T, Grindlay J, Manson C, Schiebel E (2000). The Bub2p spindle checkpoint links nuclear migration with mitotic exit. Molecular Cell **6** (1): 1-10.
- Pereira G, Manson C, Grindlay J, Schiebel E (2002). Regulation of the Bfa1p-Bub2p complex at spindle pole bodies by the cell cycle phosphatase Cdc14p. The Journal of Cell Biology **157** (3): 367-379.
- Pereira G, Schiebel E (2003). Separase regulates INCENP-Aurora B anaphase spindle function through Cdc14. Science **302** (5653): 2120-2124.
- Peters JM (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. Nature Reviews Molecular Cell Biology **7** (9): 644-656.

- Peters JM (1998). SCF and APC: the Yin and Yang of cell cycle regulated proteolysis. Current Opinion in Cell Biology **10** (6): 759-768.
- Petes TD, Botstein D (1977). Simple Mendelian inheritance of the reiterated ribosomal DNA of yeast. Proceedings of the National Academy of Science USA **74** (11): 5091-5095.
- Piatti S, Venturetti M, Chiroli E, Fraschini R (2006). The spindle position checkpoint in budding yeast: the motherly care of MEN. Cell Division **1** (1): 2.
- Pringle JR, Adams AE, Drubin DG, Haarer BK (1991). Immunofluorescence methods for yeast. Methods in Enzymology **194**:565-602.
- Pruyne D, Bretscher A (2000). Polarization of cell growth in yeast. I. Establishment and maintenance of polarity states. Journal of Cell Science **113** (Pt 3): 365-375.
- Queralt E, Lehane C, Novak B, Uhlmann F (2006). Downregulation of PP2A(Cdc55) phosphatase by separate initiators mitotic exit in budding yeast. Cell **125** (4): 719-732.
- Schimmang T, Tollervey D, Kern H, Frank R, Hurt EC (1989). A yeast nucleolar protein related to mammalian fibrillarin is associated with small nucleolar RNA and is essential for viability. The EMBO Journal **8** (13): 4015-4024.
- Schwab M, Lutum AS, Seufert W (1997). Yeast Hct1 is a regulator of Clb2 cyclin proteolysis. Cell **90** (4): 683-693.
- Schwob E, Böhm T, Mendenhall MD, Nasmyth K (1994). The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*. Cell **79** (2): 233-244.
- Segal M, Bloom K (2001). Control of spindle polarity and orientation in *Saccharomyces cerevisiae*. Trends in Cell Biology **11** (4): 160-166.
- Shah R, Jensen S, Frenz LM, Johnson AL, Johnston LH (2001). The Spo12 protein of *Saccharomyces cerevisiae*: a regulator of mitotic exit whose cell cycle-dependent degradation is mediated by the anaphase-promoting complex. Genetics **159** (3): 965-980.
- Shaw P, Doonan J (2005). The nucleolus. Playing by different rules? Cell Cycle **4** (1). 102-105.
- Sherman F (1997). An introduction to the genetics and molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. in The Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine **6**: 302-325, ed. Meyers RA (VCH, Weinheim, Germany).
- Shirayama M, Tóth A, Gálová M, Nasmyth K (1999). APC(Cdc20) promotes exit from mitosis by destroying the anaphase inhibitor Pds1 and cyclin Clb5. Nature **402** (6758): 203-207.
- Shou W, Azzam R, Chen SL, Huddleston MJ, Baskerville C, Charbonneau H, Annan RS, Carr SA, Deshaies RJ (2002). Cdc5 influences phosphorylation of Net1 and disassembly of the RENT complex. BMC Molecular Biology **3**: 3.
- Shou W, Sakamoto KM, Keener J, Morimoto KW, Traverso EE, Azzam R, Hoppe GJ, Feldman RM, DeModena J, Moazed D, Charbonneau H, Nomura M, Deshaies RJ (2001). Net1 stimulates RNA polymerase I transcription and regulates nucleolar structure independently of controlling mitotic exit. Molecular Cell **8** (1): 45-55.
- Shou W, Seol JH, Shevchenko A, Baskerville C, Moazed D, Chen ZW, Jang J, Shevchenko A, Charbonneau H, Deshaies RJ (1999). Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex. Cell **97** (2): 233-244.
- Simanis V (2003). Events at the end of mitosis in the budding and fission yeasts. Journal of Cell Science **116** (Pt 21): 4263-4275.
- Sinclair DA, Guarente L (1997). Extrachromosomal rDNA circles - a cause of aging in yeast. Cell **91** (7): 1033-1042.
- Skowyra D, Craig KL, Tyers M, Elledge SJ, Haper JW (1997). F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. Cell **91** (2): 209-219.

- Smith JS, Boeke JD (1997). An unusual form of transcriptional silencing in yeast ribosomal DNA. Genes & Development **11** (2): 241-54.
- Stegmeier F, Amon A (2004). Closing mitosis: the functions of the Cdc14 phosphatase and its regulation. Annual Review of Genetics **38**: 203-232.
- Stegmeier F, Huang J, Rahal R, Zmolik J, Moazed D, Amon A (2004). The replication fork block protein Fob1 functions as a negative regulator of the FEAR network. Current Biology **14** (6): 467-480.
- Stegmeier F, Visintin R, Amon A (2002). Separase, polo kinase, the kinetochore protein Slk19, and Spo12 function in a network that controls Cdc14 localization during early anaphase. Cell **108** (2): 207-220.
- Straight AF, Marshall WF, Sedat JW, Murray AW (1997). Mitosis in living budding yeast: anaphase A but no metaphase plate. Science **277** (5325): 574-578.
- Straight AF, Shou W, Dowd GJ, Turck CW, Deshaies RJ, Johnson AD, Moazed D (1999). Net 1, a Sir2-associated nucleolar protein required for rDNA silencing and nucleolar integrity. Cell **97** (2): 245-256.
- Sullivan M, Higuchi T, Katis VL, Uhlmann F (2004). Cdc14 phosphatase induces rDNA condensation and resolves cohesin-independent cohesion during budding yeast anaphase. Cell **117** (4): 471-482.
- Sullivan M, Lehane C, Uhlmann F (2001). Orchestrating anaphase and mitotic exit: separase cleavage and localization of Slk19. Nature Cell Biology **3** (9): 771-777.
- Sullivan M, Uhlmann F (2003). A non-proteolytic function of separase links the onset of anaphase to mitotic exit. Nature Cell Biology **5** (3): 249-254.
- Taylor GS, Liu Y, Baskerville C, Charbonneau H (1997). The activity of Cdc14p, an oligomeric dual specificity protein phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*, is required for cell cycle progression. The Journal of Biological Chemistry **272** (38): 24054-24063.
- Tomson BN, D'Amours D, Adamson BS, Aragón L, Amon A (2006). Ribosomal DNA transcription-dependent processes interfere with chromosome segregation. Molecular and Cellular Biology **26** (16): 6239-6247.
- Torres-Rosell J, Machín F, Jarmuz A, Aragón L (2004). Nucleolar segregation lags behind the rest of the genome and requires Cdc14p activation by the FEAR network. Cell Cycle **3** (4): 496-502.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1992). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. Biotechnology **24**: 145-149.
- Trautmann S, McCollum D (2002). Cell cycle: new functions for Cdc14 family phosphatases. Current Biology **12** (21): R733-735.
- Trautmann S, Rajagopalan S, McCollum D (2004). The *S. pombe* Cdc14-like phosphatase Clp1p regulates chromosome biorientation and interacts with Aurora kinase. Developmental Cell **7** (5): 755-762.
- Trautmann S, Wolfe BA, Jorgensen P, Tyers M, Gould KL, McCollum D (2001). Fission yeast Clp1p phosphatase regulates G2/M transition and coordination of cytokinesis with cell cycle progression. Current Biology **11** (12): 931-940.
- Traverso EE, Baskerville C, Liu Y, Shou W, James P, Deshaies RJ, Charbonneau H (2001). Characterization of the Net1 cell cycle-dependent regulator of the Cdc14 phosphatase from budding yeast. The Journal of Biological Chemistry **276** (24): 21924-21931.
- Tschochner H, Hurt E (2003). Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. TRENDS in Cell Biology **13** (5): 255-263.
- Uhlmann, F (2001). Secured cutting: controlling separase at the metaphase to anaphase transition. EMBO Reports **2** (6): 487-492.

- Uhlmann F, Wernic D, Poupart MA, Koonin EV, Nasmyth K (2000). Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. Cell **103** (3): 375-386.
- Vázquez-Novelle MD, Esteban V, Bueno A, Sacristán MP (2005). Functional homology among human and fission yeast Cdc14 phosphatases. The Journal of Biological Chemistry **280** (32): 29144-29150.
- Visintin C, Tomson BN, Rahal R, Paulson J, Cohen M, Taunton J, Amon A, Visintin R (2008). APC/C-Cdh1-mediated degradation of the Polo kinase Cdc5 promotes the return of Cdc14 into the nucleolus. Genes & Development **22** (1): 79-90.
- Visintin R, Craig K, Hwang ES, Prinz S, Tyers M, Amon A (1998). The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. Molecular Cell **2** (6): 709-718.
- Visintin R, Hwang ES, Amon A (1999). Cfi1 prevents premature exit from mitosis by anchoring Cdc14 phosphatase in the nucleolus. Nature **398** (6730): 818-823.
- Visintin R, Prinz S, Amon A (1997). CDC20 and CDH1: a family of substrate-specific activators of APC-dependnet proteolysis. Science **278** (5337): 460-463.
- Visintin R, Stegmeier F, Amon A (2003). The role of the polo kinase Cdc5 in controlling Cdc14 localization. Molecular Biology of the Cell **14** (11): 4486-4498.
- Wai HH, Vu L, Oakes M, Nomura M (2000). Complete deletion of yeast chromosomal rDNA repeats and integration of a new rDNA repeat: use of rDNA deletion strains for functional analysis of rDNA promoter elements in vivo. Nucleic Acids Research **28** (18): 3524-3534.
- Wan J, Xu H, Grunstein M (1992). CDC14 of *Saccharomyces cerevisiae*. Cloning, sequence analysis, and transcription during the cell cycle. The Journal of Biological Chemistry **267** (16): 11274-11280.
- Wang BD, Yong-Gonzalez V, Strunnikov AV (2004). Cdc14p/FEAR pathway controls segregation of nucleolus in *S. cerevisiae* by facilitating condensin targeting to rDNA chromatin in anaphase. Cell Cycle **3** (7): 960-967.
- Wang Y, Ng TY (2006). Phosphatase 2A negatively regulates mitotic exit in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular Biology of the Cell **17** (1): 80-89.
- Wang Y, Shirogane T, Liu D, Harper JW, Elledge SJ (2003). Exit from exit: resetting the cell cycle through Amn1 inhibition of G protein signaling. Cell **112** (5): 697-709.
- Wegerer A (2004). Funktionelle Domänen von Mitoseregulatoren in *Saccharomyces cerevisiae*. Doktorarbeit am Institut für industrielle Genetik, Universität Stuttgart.
- Wiese A, Wilms B, Sylatk C, Mattes R, Altenbuchner J (2001). Cloning, nucleotide sequence and expression of a hydantoinase and carbamoylase gene from *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 in *Escherichia coli* and comparison with corresponding genes from *Arthrobacter aurescens* DSM 3747. Applied Microbiology and Biotechnology **55** (6): 750-757.
- Wolfe BA, Gould KL (2004). Fission yeast Clp1p phosphatase affects G2/M transition and mitotic exit through Cdc25p inactivation. The EMBO Journal **23** (4): 919-929.
- Wolfe BA, McDonald WH, Yates JR 3rd, Gould KL (2006). Phospho-regulation of the Cdc14/Clp1 phosphatase delays late mitotic events in *S. pombe*. Developmental Cell **11** (3): 423-430.
- Woodbury EL, Morgan DO (2007). Cdk and APC activities limit the spindle-stabilizing function of Fin1 to anaphase. Nature Cell Biology **9** (1): 106-112.
- Xu S, Huang HK, Kaiser P, Latterich M, Hunter T (2000). Phosphorylation and spindle pole body localization of the Cdc15p mitotic regulatory protein kinase in budding yeast. Current Biology **10** (6): 329-332.
- Yoshida S, Toh-e A (2002). Budding yeast Cdc5 phosphorylates Net1 and assists Cdc14 release from the nucleolus. Biochemical Biophysical Research Communications **294** (3): 687-691.

- Yoshida S, Toh-e A (2001). Regulation of the localization of Dbf2 and Mob1 during cell division of *Saccharomyces cerevisiae*. Genes & Genetic Systems **76** (2): 141-147.
- Zeng X, Kahana JA, Silver PA, Morpew MK, McIntosh JR, Fitch IT, Carbon J, Saunders WS (1999). Slk19p is a centromere protein that functions to stabilize mitotic spindles. The Journal of Cell Biology **146** (2): 415-425.

DANKSAGUNG

Da ohne die Unterstützung und Hilfe meiner Familie, Freunde und Kollegen diese Arbeit nicht entstanden wäre, möchte ich ihnen an dieser Stelle danken.

Besonders danken möchte ich Prof. Dr. Wolfgang Seufert für die Bereitstellung des interessanten Themas und die hervorragende Betreuung meiner Arbeit. Er hat sich immer Zeit genommen für Diskussionen und Fragen meine Arbeit betreffend, die im Wesentlichen zur ihrer Entwicklung beigetragen haben. Nicht zu vergessen seien auch seine Hilfe und großartige Unterstützung bei unserer Publikation.

Weiterhin gilt mein Dank Prof. Dr. Herbert Tschochner für seine Bereitschaft, meine Arbeit zu begutachten und den restlichen Mitgliedern meiner Prüfungskommission Prof. Dr. Stephan Schneuwly, Prof. Dr. Reinhard Wirth und Prof. Dr. Gernot Längst.

Außerdem bedanke ich mich ganz herzlich bei meinen Laborkollegen in Stuttgart und Regensburg für ihre Geduld und die zahlreichen guten Tipps. In diesem Zusammenhang gilt mein spezieller Dank Dr. Michael Schwab, Andrea Brücher, Heidi Bolay, Nicole Diergardt, Jörg Reißing, Veronika Meier, Antje Machetanz-Morokane, Dr. Wolfgang Mages, Frank Richter, Esther Owsianowski und Sylvia Osswald. Ganz besonders möchte ich mich an dieser Stelle nochmals bei Dr. Michael Schwab und Andrea Brücher für ihre Unterstützung bei der Publikation bedanken. Unseren derzeitigen und ehemaligen Diplomanden Christa, Lea, Sabine, Franz, Britta, Nicholas und Ulrike möchte ich natürlich auch danken nicht zuletzt wegen der guten Laboratmosphäre. Sabine Schneider danke ich für die kompetente Hilfe bei allen bürokratischen Dingen und die reichliche Ausstattung an Büromaterialien.

Bei meinen Freunden Cécile, Jess, Doro, Cor, Rosi, Simone, Anke, Tina, Susanne, Andrea, Heidi, Lea, Birgit, Marina und Guido bedanke ich mich, da sie immer ein offenes Ohr für mich hatten und mir mit Rat und Tat zur Seite standen. Auch Tobi hat maßgeblich dazu beigetragen, dass diese Arbeit entstehen konnte. Ihm möchte ich danken, für sein Verständnis und die Bereitschaft mir zuzuhören.

Was wäre ich ohne meine Familie? Bei meinen Eltern, meinem Bruder Julian, Anne, Bernd, Roswitha und Gerhard bedanke ich mich für ihre Geduld, die guten Gespräche und ihre Unterstützung bei den Umzügen. In diesem Zusammenhang sollen auch Raimund und Klaus nicht unerwähnt bleiben. Mein ganz besonderer Dank gilt meinen liebevollen Eltern, denn sie haben es mir ermöglicht, diesen Weg zu gehen.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Christine Geil
geboren am: 01.07.1979 in Speyer
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Anschrift: Weidensee-Hof, 67376 Harthausen

Schulbildung

09/1985-07/1989 Grundschole Harthausen

09/1989-06/1998 Edith-Stein-Gymnasium, Speyer
Abschluss: **allgemeine Hochschulreife**

Studium

10/1998-10/2004 Studium der technischen Biologie, Universität Stuttgart
Abschluss: **Diplom Biologin** (technisch orientiert)

09/2002-12/2002 **Studienarbeit**, Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ),
Heidelberg, Institut für molekulare Immunologie, Prof. Dr. Günter
J. Hämmerling (Betreuer: PD Dr. med. Frank Momburg),
Titel: Die Expression rekombinanter MHC-Klasse-II Moleküle in *S.*
cerevisiae und Mammalia-Zellen

07/2003-08/2003 **Praktikum**, Happy Planet Foods Inc., Vancouver, Kanada

09/2003-12/2003 **Praktikum**, BASF Plant Science, North Carolina, USA

01/2004-10/2004 **Diplomarbeit**, Universität Stuttgart, Institut für Industrielle Genetik, Prof. Dr.
Wolfgang Seufert,
Titel: Die Rolle der Phosphatase Cdc14 im Zellteilungszyklus und
ihre nukleolare Verankerung

Promotion

11/2004-12/2005 Universität Stuttgart, Institut für Industrielle Genetik, Prof. Dr.
Wolfgang Seufert

01/2006-09/2008 Universität Regensburg, Institut für Biochemie, Genetik und
Mikrobiologie, Lehrstuhl für Genetik, Prof. Dr. Wolfgang Seufert,
Titel: Tof2 - ein nukleolarer Aktivator der Phosphatase Cdc14
unterstützt die rDNA Trennung in *S. cerevisiae*
Vortrag: The nucleolar protein Tof2 cooperates with Cdc14 phosphatase,
September 2006, RZBB (2. Symposium zum geplanten Regensburger
Zentrum für Biochemie und Biophysik), Kloster Kostenz
Publikation: Geil C, Schwab M, Seufert W (2008). A nucleolus-
localized activator of Cdc14 phosphatase supports rDNA segregation in yeast
mitosis. Current Biology 18 (13): 1001-1005.

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Regensburg, Juni 2008
